

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

MÔNICA REGINA DE LIMA CAPILLE

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL
DA COLORAÇÃO DE GRAM POR BASIDIOMICETOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2017

MÔNICA REGINA DE LIMA CAPILLE

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL
DA COLORAÇÃO DE GRAM POR BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior em Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marlene Soares

CURITIBA

2017

MÔNICA REGINA DE LIMA CAPILLE

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO RESIDUAL
DA COLORAÇÃO DE GRAM POR BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – PROF. DR. GUSTAVO COUTO

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – PROF. DR^a. GISELLE MARIA MACIEL

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – PROF. DR^a. MARLENE SOARES

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenador de Curso – PROF. Me ALESSANDRO FEITOSA MACHADO

Curitiba, 01 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Estanislava Stoiny de Lima pelos momentos de ausência, por todo amor, trabalho e dedicação desta mulher lutadora. Mesmo não estando aqui mais entre nós será sempre minha heroína.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Marlene Soares, por ter me ajudado em todo o processo e ter concedido toda a paciência, confiança, incentivo, apoio, compreensão, amizade e ensinamentos.

À Professora Dra. Giselle Maria Maciel pelo tempo e ajuda.

Agradeço em também à minha amiga Suelly Madeleine dos Santos de Lucca que sempre esteve dando força, incentivo e companheirismo.

Aos meus amigos da UTFPR que sempre estiveram presentes, que mesmo não citados, sabem do respeito e da gratidão que tenho por todos eles.

À minha família pelo incentivo, apoio e compreensão por minha ausência. E principalmente ao meu marido Roberson Luiz Capille por toda paciência e amor concedido a mim.

E mais importante de todos à minha mãe que sempre me apoiou em todos meus projetos.

RESUMO

CAPILLE, Mônica Regina de. **Avaliação da biodegradação de resíduos da coloração de Gram por Basidiomicetos**. 2017. 70 f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia em Processos Ambientais)- Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Curitiba, 2017.

Corantes e seus resíduos causam inúmeros problemas ambientais quando são inadequadamente dispostos no meio ambiente. Esse estudo avaliou a biodegradação de uma solução residual da coloração de Gram (SRCG) com diferentes espécies de basidiomicetos. Essa técnica de coloração é usada na caracterização de bactérias em laboratórios de Microbiologia. A pesquisa foi dividida em quatro etapas. Na primeira buscou-se avaliar se a adição de nutrientes nos meios de cultivo com corantes favoreceria ou não a biodegradação. Para isso, nove basidiomicetos foram cultivados em placas de Petri em meios contendo 6,25% da SRCG, solidificados com ágar ou ágar batata dextrose. Foi observado que a concentração do corante não inibiu significativamente o crescimento microbiano e que a suplementação de nutrientes favoreceu a descoloração do meio. No segundo ensaio foi avaliado o efeito do aumento da concentração do corante sobre o crescimento fúngico, expondo os basidiomicetos a 6,25%, 12,5%, 25% e 50% de SRCG. Foi observado que com 50% e 25% da concentração ocorreu à inibição o crescimento microbiano, indicando a toxicidade da solução. Nesse estudo o fungo *Pleurotus ostreatus* foi escolhido para estudos em meio líquido, a partir da análise estatística dos dados. O terceiro estudo ocorreu através de um delineamento fatorial completo 2³. Os fatores estudados foram: cultivo estático ou agitado, adição ou não de casca de arroz, adição de glicose nas concentrações de 10 e 20 g/L. Através do acompanhamento da descoloração por UV-Vis e da concentração de fenólicos pelo método de Folin- Ciocalteau, observou-se que a melhor condição foi com glicose 20 g/L, sem agitação e sem adição de casca de arroz, resultando na descoloração de 96,5% e remoção de fenóis 97,8%. A análise Cinética da biodegradação indicou que até no terceiro dia do experimento com o *P. ostreatus* houve atividade microbiana intensa, com o consumo de glicose e remoção simultânea de cor (67%) e de compostos fenólicos de 1456,3 mg GAE/g para 8,7 mg GAE/g. Contudo, observou-se que a descoloração do meio pode ter ocorrido sob forte influência de processos de adsorção do corante no micélio fúngico.

Palavras-chave: Corantes trifenilmetano; *Pleurotus ostreatus*; Degradação de corantes.

ABSTRACT

CAPILLE, Mônica Regina de. Evaluation of biodegradation of residues from Gram staining by Basidiomycetes. 2017. 70 f. Completion of course work (Technology in Environmental Processes) - Academic Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná, Câmpus Curitiba, 2017.

Dyes and their residues cause numerous environmental problems when they are improperly disposed of in the environment. This study evaluated the biodegradation of a residual solution of Gram staining (SRCG) with different basidiomycete species. This staining technique is used in the characterization of bacteria in Microbiology laboratories. The research was divided into four stages. In the first one, it was tried to evaluate if the addition of nutrients in the media of culture with dyes would favor or not the biodegradation. For this, nine basidiomycetes were cultured in Petri dishes in media containing 6.25% of SRCG, solidified with agar or potato dextrose agar. It was observed that the concentration of the dye did not significantly inhibit the microbial growth and that the nutrient supplementation favored the discoloration of the medium. In the second assay the effect of increasing the concentration of the dye on the fungal growth was evaluated, exposing the basidiomycetes to 6.25%, 12.5%, 25% and 50% of SRCG. It was observed that with 50% and 25% of the concentration the inhibition occurred the microbial growth, indicating the toxicity of the solution. In this study the *Pleurotus ostreatus* fungus was chosen for studies in liquid medium, based on the statistical analysis of the data. The third study was carried out through a complete factorial design 2³. The factors studied were: static or agitated cultivation, addition or absence of rice husk, addition of glucose at concentrations of 10 and 20 g / L. By following the UV-Vis discolouration and the phenolic concentration by the Folin-Ciocalteau method, it was observed that the best condition was 20 g / L glucose, without agitation and without addition of rice husk, resulting in discoloration of 96.5% and removal of phenols 97.8%. Kinetic analysis of biodegradation indicated that up to the third day of the experiment with *P. ostreatus* there was intense microbial activity, with glucose consumption and simultaneous removal of color (67%) and phenolic compounds from 1456.3 mg GAE / g for 8.7 mg GAE / g. However, it has been observed that the discoloration of the medium may have occurred under strong influence of dye adsorption processes on the fungal mycelium.

Keywords: Triphenylmethane dyes; *Pleurotus ostreatus*; Degradation of dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos corantes utilizados em colorações de Gram.	18
Figura 2 - Estudos desenvolvidos nesta pesquisa.	24
Figura 3 - Fluxograma do Estudo 1, de biodescoloração de resíduos de coloração de Gram em meios dispostos em placas de Petri.	26
Figura 4 - Esquematização do traçado para a medição do crescimento radial (R = raio).	27
Figura 5 - Curva padrão de Ácido Gálico usada para os cálculos de fenólicos totais.	31
Figure 6 - Curva padrão Glicose	33
Figura 7 - Fotografia com a verificação da descoloração dos meios de cultivo contendo 6,25% de resíduo de coloração de Gram, após 4 dias de cultivo a 28°C.	38
Figure 8 - Fotografias das placas de Petri com os cultivos do Estudo 2, após 4 ou 7 dias de crescimento de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28°C, em meio ABD com diferentes concentrações de resíduo de corantes de Gram.	41
Figure 9 - Espectro de varredura dos brancos do Estudo 3, comparando controles com e sem adição de casca de arroz	43
Figura 10 - Fotografia do estudo 3 Biodegradação Fúngica em Cultivo Líquido, degradação de cor após 10 dias de cultivo com agitação e estático.	45
Figura 11 - Gráfico de dessorção do corante (λ 580 nm) comparando estudos com e sem casca de arroz	46
Figura 12 - Fotografia de amostras do Estudo 3, no final do cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> , a 28°C, em meio contendo resíduo de corantes de coloração de Gram sob diferentes condições de agitação, concentração de glicose e adição de casca de arroz.	48
Figura 13 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos no experimento 3, considerando a Remoção da Cor observada.	49
Figura 14 - Diagrama de Pareto, com o efeito dos fatores na Remoção da Cor ($\alpha=0,05$).	50
Figure 15 - Gráficos de superfície de resposta, mostrando o efeito dos fatores agitação, adição de casca de arroz e concentração de glicose na remoção da cor dos cultivos ($\alpha=0,05$).	50

Figura 16 - Gráfico de varredura de cor com todos os estudos e suas variações.	51
Figura 17 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos no experimento 3, considerando a degradação de fenólicos do meio.....	54
Figure 18 - Gráfico de superfície de resposta, mostrando o efeito dos fatores glicose e agitação na remoção de fenóis do meio de cultivo ($\alpha=0,05$).	54
Figura 19 - Absorbância do meio de cultivo ao longo do tempo, durante estudo de biodegradação de corantes residuais da Coloração de Gram, por <i>Pleurotus ostreatus</i> , em cultivo submerso estático, a 28°C (em vermelho, valor inicial)..	55
Figura 20 - Gráfico de varredura do acompanhamento do cultivo de <i>P. ostreatus</i> , com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.	56
Figura 21 - Gráfico correlacionando o consumo de glicose pelo microrganismo com a descoloração observada no meio.	56
Figura 22 - Gráfico correlacionando descoloração com atividade enzimática..	57
Figura 23 - Gráfico de acompanhamento da atividade de Lacase e da concentrações de compostos fenólicos, durante acompanhamento do cultivo de <i>P. ostreatus</i> , com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.	58
Figure 24 - Gráfico de varredura de remoção de aromáticos durante acompanhamento do cultivo de <i>P. ostreatus</i> , com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Otimização da degradação de resíduos de coloração de Gram - Variáveis níveis de estudo e matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (n=2; $\alpha = 0,05$).....	29
Tabela 2 - Velocidade de crescimento fúngico, medida durante cultivo em placas de Petri, a 28°C, em meios com e sem resíduo de corantes de coloração de Gram na concentração de 6,25%. (n=4).....	35
Tabela 3 - Comparação da velocidade de crescimento fúngico e da descoloração dos meios contendo 6,25% de corantes residuais da coloração de Gram (cultivo em placas de Petri, a 28°C).	37
Tabela 4 - Velocidade de crescimento fúngico, observada durante cultivo em placas de Petri em 28°C, em ágar batata dextrose adicionado de diferentes concentrações do resíduo de corantes de coloração de Gram (n=8)	39
Tabela 5 - Remoção de cor observada ($\lambda = 580$ nm) nos cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> em resíduos de coloração de Gram (12,5%), após 7 dias em 28°C (n=2).....	47
Tabela 6 - Análise de variância dos efeitos dos fatores sobre a remoção da cor (ou seja, degradação do grupo cromóforo) no meio de cultivo ($\alpha < 0,05$).	48
Tabela 7 - Remoção de fenólicos observada nos cultivos de <i>Pleurotus ostreatus</i> em resíduos de coloração de Gram (12,5%) , após 10 dias, em 28°C. (n=2).....	53
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores sobre a concentração final de fenóis (ou seja, sua degradação) no meio de cultivo ($\alpha < 0,05$).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 REFERENCIAL TEÓRICO	16
4.1 CORANTES E O MEIO AMBIENTE	16
4.2 CORANTES UTILIZADOS EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA.....	17
4.3 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA	21
5 METODOLOGIA	24
5.1 AMOSTRA.....	25
5.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS E PREPARO DOS INÓCULOS	25
5.3 ESTUDO 1 - EFEITO DA PRESENÇA DE NUTRIENTES NA DEGRADAÇÃO DO CORANTE	26
5.4 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO	28
5.5 ESTUDO 3 - BIODEGRADACAO FÚNGICA EM CULTIVO LÍQUIDO.....	28
5.6 ESTUDO 4 – ESTUDO CINÉTICO DA BIODEGRADAÇÃO	29
5.7 ANÁLISES.....	30
5.7.1 Remoção da Cor.....	30
5.7.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais.....	30
5.7.3 Teste de Adsorção do Corante no Micélio.....	32
5.7.4 Determinação de Açúcares Redutores	33
5.7.5 Determinação da atividade de Lacase, MnP e LiP	34
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 ESTUDO 1 - EFEITO DA PRESENÇA DE NUTRIENTES NA DEGRADAÇÃO DO CORANTE	35
6.2 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.....	39
6.3 ESTUDO 3 - BIODEGRADACAO FÚNGICA EM CULTIVO LÍQUIDO.....	42
6.3.1 Degradação da Cor	42

6.3.2 Degradação de fenólicos.....	52
6.4 ESTUDO 4 – ESTUDO CINÉTICO DA BIODEGRADAÇÃO	55
7 CONCLUSÃO	62
8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Quando despejados nos corpos d'água sem tratamento adequado os corantes podem alterar a coloração do rio deixando-o esteticamente modificado. A turvação da água diminui a radiação solar absorvida e, conseqüentemente, há o comprometimento das atividades fotossintéticas, minimizando a produção primária e alterando todo equilíbrio ecossistêmico (ALVES FILHO, 2012).

Os corantes são muito utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética, têxtil e de saúde e, mesmo em pequenas concentrações, causam efeitos adversos, como a morte e o atraso na regeneração de organismos aquáticos. Classificados como contaminantes emergentes, eles trazem danos à biota e representam um risco iminente para a saúde humana (ALVES FILHO, 2012).

As práticas desenvolvidas em laboratórios de microbiologia (de ensino, pesquisa ou de análises clínicas) incluem o preparo de meios de cultivo e colorações diversas para o estudo dos microrganismos. As colorações realizadas mais frequentemente incluem os corantes: cristal violeta, violeta de genciana, fucsina, safranina, verde malaquita e azul de metileno (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012).

Em 2012, foi realizada uma pesquisa por alunos de Biomedicina da Universidade FeeVale sobre o descarte de corantes utilizados em 22 laboratórios de microbiologia, na região do Vale dos Sinos - RS. O estudo mostrou que 63,6% dos resíduos foram descartados diretamente na pia/esgoto, o que pode trazer a longo prazo danos ao meio ambiente e à saúde humana, em função dos efeitos cumulativos (ALGAYER; RAUPP; CANTARELLI, 2012).

De acordo com a Resolução da CONAMA 358, de 29 de abril de 2005, considera-se Resíduo Químico de Serviços de Saúde (RQSS) (CONAMA, 2005):

Todo material ou substância com característica de periculosidade, quando não forem submetidos a processo de reutilização ou reciclagem, que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade. (CONAMA, 2005 p. 2)

De acordo com (ZOCOLO *et al.*, 2014) foram encontrados em todo o mundo corantes dispersos em rios e sedimentos e a atividade mutagênica de águas superficiais e sedimentos foi responsabilizada pela existência desses compostos. Além disso, os corantes sintéticos podem apresentar-se tóxicos aos organismos aquáticos (RIBEIRO; UMBUZEIRO, 2014).

Sabe-se também que o tratamento convencional de águas residuais coloridas, compreendendo lagoas aeróbicas ou lodos ativados, não é eficiente na remoção ou degradação biológica destes corantes sendo necessário um processo de tratamento alternativo para conseguir esta remoção (DA SILVA *et al.*, 2016).

Na UTFPR- Câmpus Curitiba, os resíduos de coloração de GRAM são gerados nas disciplinas de Microbiologia e Microbiologia Ambiental, sendo acondicionados em recipientes plásticos de polipropileno até serem recolhidos pela empresa Essencis Soluções Ambientais. Segundo informações obtidas na empresa esse resíduo é tratado por processo de solidificação, que tem por finalidade melhorar as características físicas do resíduo e diminuir a superfície de exposição para evitar a lixiviação dos constituintes do resíduo, antes de dispor em aterro industrial.

Dois trabalhos de conclusão de curso da UTFPR-Câmpus Curitiba foram realizados considerando a biodegradação da solução residual da coloração de Gram (SRCG). Nozu e Saldanha (2007) observaram a redução de 86,4% da cor do resíduo e 14,4% de degradação de compostos aromáticos utilizando o basidiomiceto *P. sajor caju*, com resíduo de corante na concentração de 12,5%. Enquanto Souza (2009) obteve descoloração de 95,3 % e degradação de aromáticos de 70% e concluíram que o tratamento envolvendo microrganismos é interessante para a redução de elementos recalcitrantes.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se toda a problemática ambiental dos corantes e sua ampla e diária aplicação em práticas de ensino de microbiologia e em laboratórios de análises clínicas, tornam-se necessários estudos para o tratamento dos efluentes coloridos gerados nesses ambientes. Este trabalho verifica a possibilidade de tratamento alternativo aos convencionais e de baixo custo para evitar o descarte do resíduo de corantes.

Nesse trabalho buscou-se dar continuidade à pesquisa de Nozu e Saldanha (2007) e Souza (2009), que centralizaram o estudo no basidiomiceto *Pleurotus sajor caju* e obtiveram bons resultados conseguindo remoção de cor de (95,3 - 96,5%) e degradação de aromáticos (70% - 52%) para concentrações 12,5% e 6,25% do resíduo. Nesse sentido, o intuito foi avaliar como outros fungos da decomposição branca da madeira se comportariam na presença dos corantes da coloração de Gram, selecionando o melhor para proporcionar alternativas de tratamento para esse resíduo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biodegradação da solução residual da coloração de Gram através de basidiomicetos, escolhendo a condição com melhores resultados para acompanhamento cinético.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar se a presença de nutrientes no meio de cultivo influencia na capacidade dos basidiomicetos em degradar os corantes, através do cultivo em placas de Petri contendo 6,25% da SRCG, solidificada com ágar ou ágar batata dextrose;
- ✓ Verificar o comportamento do fungo com o aumento da concentração do corante, segundo a degradação da cor e a velocidade do crescimento radial, selecionando um microrganismo para continuidade do trabalho em meio líquido;
- ✓ Otimizar a degradação da SRCG através de um delineamento fatorial 2^3 , usando o microrganismo que apresentou os melhores resultados nos estudos anteriores;
- ✓ Acompanhar a cinética de biodegradação na melhor condição definida no delineamento experimental, durante 14 dias.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 CORANTES E O MEIO AMBIENTE

Corantes são substâncias muito usadas para a coloração de vários substratos, tais como: alimentos, plásticos, coloração de laboratório e também para materiais têxteis. A indústria têxtil produz grandes quantidades de águas residuais durante o processo de lavagem e tingimento, que contém grandes quantidades de corante, e são descartados junto com o efluente têxtil (MARTÍNEZ-HUITLE *et al.*, 2012).

Os corantes provenientes das indústrias têxteis são os mais difíceis de serem tratados porque possuem origem sintética e estrutura aromática complexa, tornando-os estáveis e de difícil biodegradação (ROSOLEN *et al.*, 2004). São considerados passivos ambientais quando lançados, sem tratamento, em águas naturais, pois podem atrapalhar na fotossíntese e na solubilidade de gases, porque fazem com que a água fique turva, diminuindo a penetração da radiação solar no corpo d'água (SILVA, 2011).

Os tratamentos químicos continuam sendo os principais procedimentos de tratamento de águas residuais usadas nas indústrias têxteis, e muitas vezes resultam na produção de outras formas de poluentes químicos (EL- RAHIM *et al.*, 2017). Estes efluentes são geralmente tratados por processos físico-químicos como adsorção, filtração de membrana, floculação química e química combinada com flutuação, precipitação e ozonização (MUHD; BAGHERI; BEE, 2014). No entanto, essas tecnologias são caras, e geralmente ineficientes para mineralização completa de corantes (FU; VIRARAGHAVAN, 2002). E os métodos baseados em biodegradação podem não funcionar, pois os corantes sintéticos são, em sua maioria, xenobióticos, ou seja, os microrganismos em rios não possuem enzimas específicas para a degradação deste tipo de composto sob condições aeróbias e sob condições anaeróbias o processo de degradação se dá muito lentamente (TROMBINI; OBARA-DOI, 2012).

4.2 CORANTES UTILIZADOS EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA

A destinação de resíduos de corantes é um problema crescente, devido aos obstáculos de determinar qual a melhor tecnologia a ser utilizada para o tratamento, qual a composição e riscos no manejo e ainda a inexistência de dados confiáveis de geração de resíduos em quase todos os estabelecimentos de saúde existentes. A geração deste efluente vem sendo afetada cada vez mais, pois os crescimentos populacionais e econômicos estão diretamente ligados (ROTONDARO, 2003).

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia e de análises clínicas, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas das bactérias associadas a infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas em esfregaços de pus ou de fluidos orgânicos. Essa informação permite ao clínico monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. É possível a análise de vários esfregaços por lâmina, o que facilita a comparação de espécimes clínicos. As lâminas podem ser montadas de forma permanente e preservadas como documentação.

O bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram desenvolveu, em 1884, a coloração Gram, uma das mais úteis, que classifica as bactérias em gram-positivas e gram-negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem.

Coloração é uma técnica para visualização através do microscópio. A técnica de coloração resume-se em esfregaço biológico seco, fixados e então corados (TORTORA, FUNKE; CASE, 2012).

Os corantes são sais compostos por um íon positivo e um íon negativo, um dos quais é colorido e conhecido como cromóforo. A cor dos assim chamados corantes básicos está no íon positivo; em corantes ácidos, está no íon negativo. As bactérias são levemente carregadas negativamente em pH 7. Desse modo, o íon positivo colorido em um corante básico é

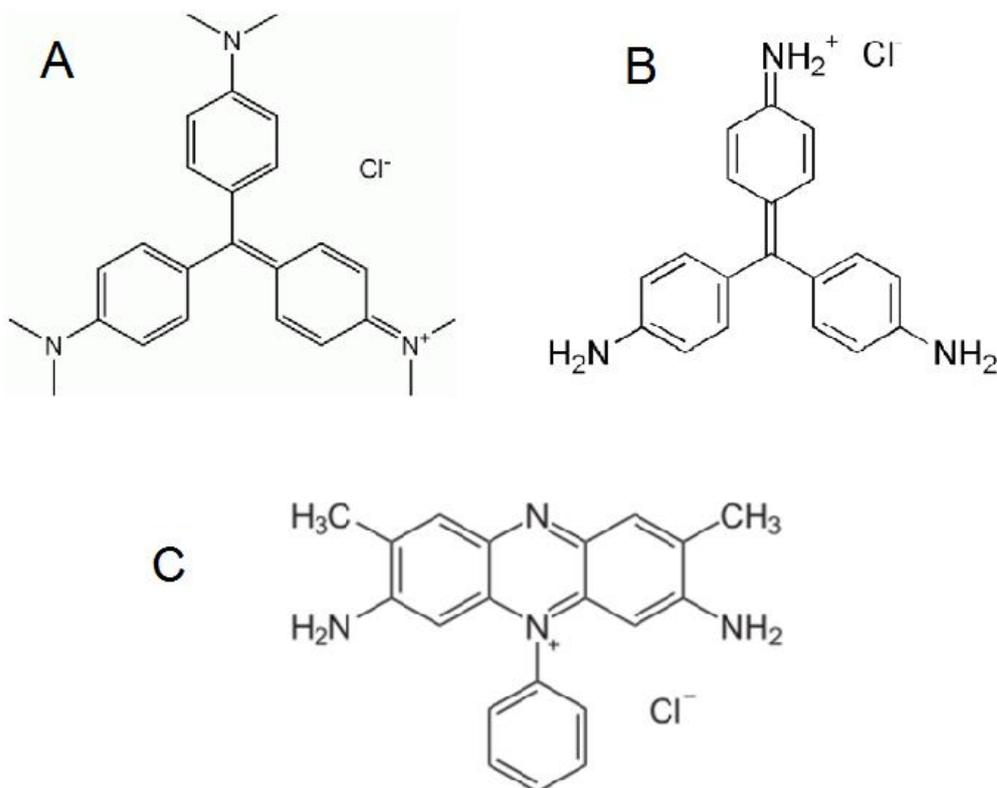
aderido à célula bacteriana carregada negativamente (TORTORA;FUNKE; CASE, 2012 p. 68).

Na coloração Gram o esfregaço bacteriano fixado é coberto sequencialmente com as seguintes soluções: cristal de violeta, iodo (Iugol) - um mordente, álcool ou solução de álcool-acetona (agente descolorante) e safranina ou fucsina (corante básico vermelho).

O corante púrpura e o iodo se combinam no citoplasma de cada bactéria, corando-a de violeta escuro ou púrpura. As bactérias que retêm essa cor após a tentativa de descolori-las com álcool são classificadas como gram-positivas; as bactérias que perdem a cor violeta escuro ou púrpura após a descoloração são classificadas como gram-negativas (TORTORA;FUNKE; CASE, 2012 p. 69).

Os corantes de Gram, como observado na Figura 1, possuem compostos aromáticos que são de difícil biodegradação (SIQUEIRA; ALMEIDA; BELDA, 1983).

Figura 1 - Estrutura dos corantes utilizados em colorações de Gram.



A: Cristal de violeta; B: Fucsina; C: Safranina
Fonte: Kunz *et al.* (2002).

O cristal de Violeta (Figura 1A) também pode ser chamado de: Cloreto de hexametil pararosanilina, violeta de genciana, violeta de anilina, cloreto de metilrosanilina, violeta de metila 6B, “brilliant violet 5B”, “violet BO”, “DCS brilliant”, “hexamethyl violet” ou “Arizon Crystal violet”. Pertence à classe dos triarilmetano. Encontra-se nas formas de pó ou cristal brilhante verde escuro. Dissolve-se na proporção um grama para 10 mL de álcool ou em 15 mL de glicerina, sendo quase insolúvel em éter, é solúvel em água fria ou quente, clorofórmio e etanol (SIQUEIRA; ALMEIDA; BELDA, 1983).

Pesquisadores chineses observaram toxicidade citogenética do violeta de genciana em células de hamster *in vitro* (AZMI; SANI; BANERJE, 1998). Mostrou-se a propriedade clastogénica (quebra de cromossomos) em cinco diferentes tipos de células de mamíferos. Assim a violeta de genciana ou cristal de violeta pode ser visto como substância perigosa (AZMI; SANI; BANERJE, 1998).

Fucsina (Figura 1B) também é chamada de: parafucsina, paramagenta, rosalina base, “basic rubin” ou “cacozone magenta N”, pertence à classe triarilmetano. É solúvel em água quente e etanol e pouco solúvel em água fria. Sua classificação segundo Colour Index é Basic Violet 2, seu número C.I. é 42.520 (SIQUEIRA; ALMEIDA; BELDA, 1983).

A safranina também é conhecida como cloreto de 3,7- diamino-2,8-dimetil-5fenilfenazino, vermelho básico 2 (Figura 1C). É um corante biológico de contraste. Pode existir também como uma trimetil safranina que tem um grupo metil agregado na posição orto-diamino mais baixo comportando-se de forma idêntica a safranina comum quando usada como corante biológico. A safranina comercial geralmente é uma mistura de ambas. Solúvel em água a 20°C e pode ser encontrada na forma de pó vermelho pardo (SIQUEIRA; ALMEIDA; BELDA, 1983).

Lugol ou solução iodo-iodetada é usada como mordente na coloração de GRAM, ou seja, tem a função específica de manter a durabilidade da cor. É um dos agente agentes antimicrobianos mais antigos e mais efetivos contra todos os tipos de bactérias, muitos esporos, vários fungos, e alguns vírus. Um mecanismo proposto para a atividade do iodo é que ele se combina ao aminoácido tirosina, componente comum de muitas enzimas e outras proteínas

celulares. Como resultado, a função proteica microbiana é inibida. De modo geral, o iodo também oxida os grupos sulfidrílica de certos aminoácidos que são importantes para manter a estrutura das proteínas (TORTORA; FUNKE; CASE 2012).

O álcool desidrata a peptidoglicana das células gram-positivas para torná-la mais impermeável ao cristal violeta-iodo. Nas células gram-negativas o álcool dissolve a membrana externa, deixando buracos na camada de peptidoglicana, pelos quais o cristal violeta-iodo se propaga (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Segundo o RDC 306/2004 Anvisa os resíduos de microbiologia devem ser autoclavados e dispostos em recipientes próprio antes de serem descartados. Em pesquisa realizada em laboratórios de 13 cidades do Rio Grande do Sul por Allgayer, Raupp e Cantarelli (2012) 63,6 % do descarte de corantes é direto na pia/esgoto e também nenhum dos laboratórios faziam tratamento nos resíduos de corantes. Isso mostra que os corantes de laboratório não têm muita fiscalização. Botton (2011) em sua dissertação de mestrado verificou que no Setor de Hematologia do Laboratório de Análise Clínica do Hospital Universitário de Santa Maria todos os resíduos químicos produzidos eram despejados na rede de esgoto, sem tratamento.

Conforme o CONAMA (2005) compõe o grupo dos RQSS, em linhas gerais, os seguintes materiais:

- Produtos hormonais, produtos antimicrobianos, citostáticos, antineoplásticos;
- Imunossupressores, digitálicos, imunomoduladores, antirretrovirais, quando descartados por serviços de saúde, farmácias;
- Resíduos saneantes, desinfetantes, desinfetantes, resíduos contendo metais pesados, reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por estes;
- Efluentes de processamento de imagem (reveladores e fixadores);
- Efluentes de equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas;
- Demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10.004 da ABNT (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos).

Universidades geram diversos resíduos e com diferentes categorias. Estudos realizados por alunos do curso de Tecnologia em Química Ambiental na Universidade Tecnológica Federal do Paraná avaliaram tratamentos para

os resíduos de corantes no qual utilizaram a biorremediação com o basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju*. Foram obtidos bons resultados através do processo de biodegradação, cultivo líquido para redução de cor e degradação de aromáticos, também mostrou potencial de toxicidade para *L. sativa* apresentando de 30 a 57% de inibição da germinação assim mostrando ser danoso para organismos aquáticos (NOZU; SALDANHA, 2007).

Souza (2009) avaliou o tratamento biológico de resíduos de corantes produzidos no laboratório de microbiologia utilizando o fungo *Pleurotus sajor-caju* e obteve descoloração de (95,3 - 96,5%) e degradação de aromáticos (70% - 52%) para concentrações 12,5% e 6,25% do resíduo.

Em sua pesquisa Kunjadia *et al.* (2012) observaram a capacidade de produção da enzima lacase sob condições sólida e líquida e verificou que o fungo *Pleurotus ostreatus* descoloriu de 92% do corante cristal violeta numa concentração de 20 mg/L. Parshetti *et al.* (2011) perceberam a descoloração completa do cristal violeta por *Agrobacterium radiobacter* numa concentração de 10 mg/L porém quando aumentou a concentração 10 vezes a capacidade de descoloração foi reduzida.

4.3 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA

Os fungos da podridão branca estão sendo muito estudados em tratamentos de biorremediação, na degradação de poluentes recalcitrantes e em efluentes industriais. Compostos xenobióticos como: clorofenóis, compostos organometálicos e compostos nitroaromáticos são alguns exemplos que são degradados por basidiomicetos lignolíticos (SOUZA; ROSADO, 2009).

Os basidiomicetos lignolíticos liberam enzimas e convertem polímeros externos em moléculas menores que são incorporadas e usadas como nutrientes. São estas as enzimas: Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Lacases (MOREIRA NETO, 2006). Fungos da podridão branca degradam três principais componentes da madeira: a celulose, a hemicelulose e a lignina deixando uma cor clara nos produtos de sua degradação (SOARES, 2000).

O gênero *Pleurotus* abriga diversas espécies, sendo todos comestíveis. Fungos do gênero *Pleurotus* sp. vêm sendo estudados por sua capacidade de colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, por produzirem corpos frutíferos (cogumelos) com elevado valor gastronômico e medicinal e por requererem menor tempo de cultivo quando comparados a outros gêneros comestíveis (GERN *et al.*, 2008). É um basidiomiceto que produz enzimas ligninolíticas tais como lacases e manganês peroxidases, mas não lignina peroxidases (PALMIERI *et al.*, 1997).

Apresentam complexo enzimático lignocelulolítico específico, com enzimas como celulases, ligninases, celobiases, lacases, xilanases e hemicelulases, que possibilitam a degradação de grande variedade de resíduos lignocelulósicos (ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

As lacases têm inúmeras aplicações biotecnológicas devido à sua capacidade de oxidar diferentes compostos fenólicos e não fenólicos. Algumas das aplicações da lacase incluem tratamento de efluentes de papel, celulose e indústrias têxteis, biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e degradação de corante (UPADHYAY, SHRIVASTAVA, AGRAWAL, 2016).

Lacase foi a principal enzima extracelular produzida pelo fungo da espécie *Pleurotus spp.* com detecção insignificante de lignina peroxidases (KUNJADIA *et al.*, 2016). Shahid *et al.* (2013) mostraram que esta enzima também desempenha um papel importante na biodegradação de corantes têxteis.

Os estudos sobre estes fungos foram iniciados devido à grande capacidade de degradar uma vasta variedade de compostos (SOUZA; ROSADO, 2009). Segundo Moreira Neto (2006) basidiomicetos ligninolíticos produzem enzimas pertencentes ao grupo das peroxidases, contendo o grupo heme, sendo as principais a lignina peroxidase, manganês peroxidase e outras peroxidases com ampla atuação, principalmente na atuação de degradação de compostos recalcitrantes.

A Lignina peroxidase (LiP) foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium*. Essas enzimas são os principais componentes na degradação de lignina por este organismo (MOREIRA NETO, 2006). Neste processo a LiP é oxidada por H₂O₂ que oxida os núcleos aromáticos da lignina

(fenólicos e não fenólicos), retira um elétron, gerando radicais aril, que se decompõem naturalmente via reação radicalar (SOUZA; ROSADO, 2009).

A LiP tem a tendência de degradar vários compostos fenólicos, como também álcoois benzílicos e dimetila, e causa rearranjos intramoleculares. Consegue também oxidar estruturas não fenólicas e metoxiladas, que as outras enzimas como lacase e Manganês Peroxidase não conseguem (SOUZA; ROSADO, 2009).

De acordo com Moreira Neto (2006), a produção de Manganês Peroxidase (MnP) é distinta a certos fungos basidiomicetos.

Esta enzima é uma glicoproteína que atua com isoenzimas, oxidando diretamente Mn(II) a Mn(III), que atua como espécie ativa nos processos de oxidação catalítica; este é quelado por ácidos orgânicos como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução, porém a MnP oxida somente estruturas fenólicas. A MnP assemelha-se à LiP pela presença do grupo heme, também dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade. Sua produção se dá juntamente com a LiP durante o metabolismo secundário, porém a regulação é realizada pela concentração de carbono e nitrogênio do meio (SOUZA; ROSADO, 2009 p. 132).

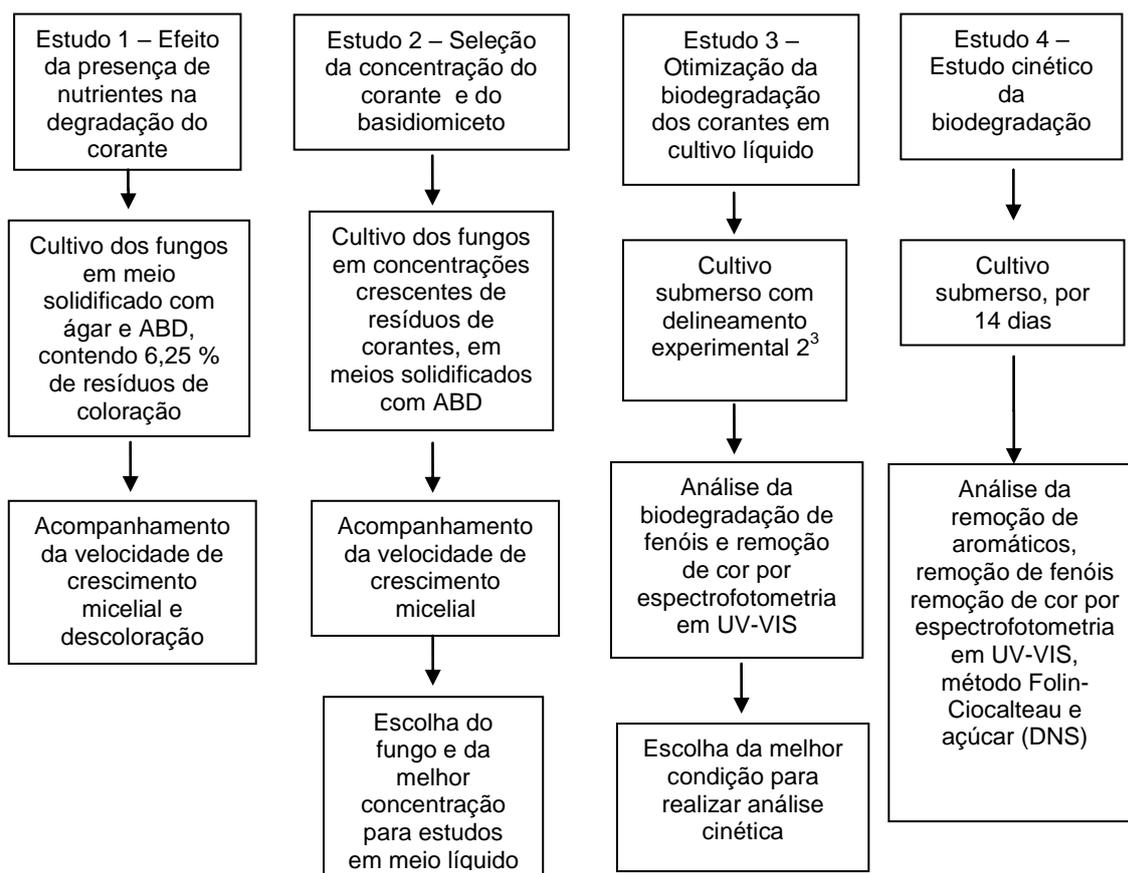
Lacases são glicoproteínas que possuem cobre no seu sítio ativo. Considerada uma oxidase que catalisa reações de oxidação, na ausência de H_2O_2 , usando O_2 como oxidante, sendo reduzido a H_2O em um processo de oxidação, envolvendo quatro elétrons (SOUZA; ROSADO, 2009).

Lacases são enzimas que não possuem especificidade quanto ao substrato, catalizando, assim, muitas estruturas aromáticas, como as fenólicas (mono, di e polifenóis). Estudos também mostram que, em presença de mediadores específicos, as lacases também podem degradar compostos não fenólicos (SOUZA; ROSADO, 2009).

5 METODOLOGIA

As análises e experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia e de Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) - Câmpus Curitiba, Sede Ecoville. A metodologia foi dividida em quatro etapas: avaliação do efeito da presença de nutrientes na degradação da SRCG, avaliação da toxicidade com aumento da concentração, otimização do cultivo em meio líquido e o estudo cinético da melhor condição (Figura 2).

Figura 2 - Estudos desenvolvidos nesta pesquisa.



5.1 AMOSTRA

Nessa pesquisa foi utilizada a solução residual da coloração de Gram (SRCG) dos laboratórios de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná e da Secretaria da Agricultura do Estado Paraná. A Solução de SRCG é composta pelos corantes: cristal violeta e fucsina ou safranina em proporções que podem variar entre os experimentos, além de lugol, água e álcool-acetona.

A amostra (5 L) foi homogeneizada e filtrada na seguinte sequência: algodão, papel filtro quantitativo (Unifil C41 faixa preta) e membrana filtrante de acetato de celulose (0,45 µm). O RPCG foi armazenado em recipientes de polipropileno desinfetado com álcool 70%, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente.

5.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS E PREPARO DOS INÓCULOS

As cepas utilizadas neste trabalho têm nível de Biossegurança 1, sendo provenientes do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia da UTFPR- Campus Curitiba, comprados no Instituto André Tosello e doadas pela Embrapa Florestas Colombo-PR.

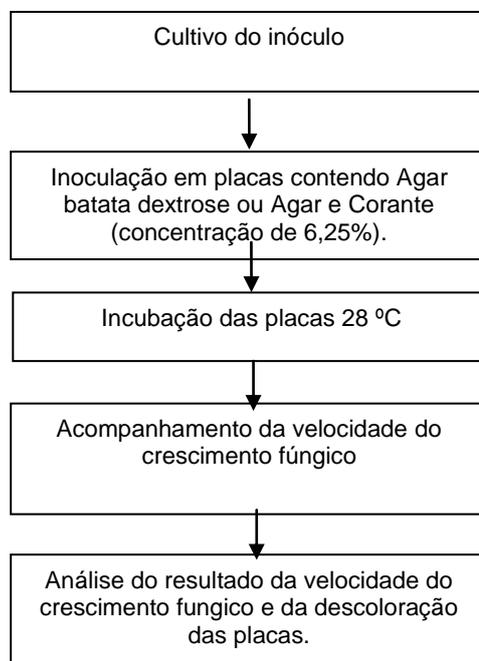
Os microrganismos foram isolados e conservados em geladeira (8°C), sendo mensalmente repicados em ágar batata dextrose (ABD) e cultivados por uma semana em 28°C (KUNJADIA *et al.*, 2016).

Para o preparo do inóculo o microrganismo isolado foi cultivado em placas de Petri por meio de repicagem simples em meio de cultura ABD, seguida de incubação em estufa a 28°C, durante sete dias. A partir dessas placas, foram retiradas circunferências de 10 mm de diâmetro por repicagem "plug" contendo micélios com 7 dias de crescimento a 28°C e inoculados nos diferentes experimentos (SOUZA, 2009).

5.3 ESTUDO 1 - EFEITO DA PRESENÇA DE NUTRIENTES NA DEGRADAÇÃO DO CORANTE

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar se a presença de nutrientes no meio de cultivo influenciaria na degradação do grupo cromóforo do corante, para a posterior continuidade da pesquisa. A Figura 3 mostra o fluxograma dessa etapa.

Figura 3 - Fluxograma do Estudo 1, de biodescoloração de resíduos de coloração de Gram em meios dispostos em placas de Petri.



Foi feita a seleção entre nove basidiomicetos: 1) *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 , 2) *Pleurotus ostreatus*, 3) Fungo isolado CF - LMB, 4) *Pleurotus djamor*, 5) Fungo isolado CP – LMB, 6) *Ganoderma* sp., 7) *Trametes* sp., 8) *Pycnoporus sanguineus*, 9) *Pleurotus sajor caju*.

Os meios utilizados foram ágar (1,5%), ágar batata dextrose (ABD), ágar com corante e ABD com corante, com RPCG na concentração de 6,25% (NOZU; SALDANHA, 2007; SOUZA, 2009). Os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 72 placas.

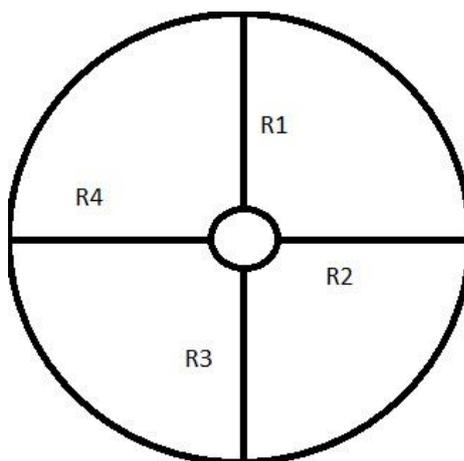
As soluções de Ágar e ABD foram autoclavadas 121°C por 15 min, sendo misturadas com a solução de corante filtrada (conforme descrito em 5.1) no momento do plaqueamento. As placas, com diâmetro uniforme de 40mm, receberam 40 mL de meio de cultivo.

O preparo do inóculo foi feito conforme descrito no item 5.2. Um "plug" foi inoculado no centro das placas de Petri, contendo meios de cultivo com 6,25% de concentração da amostra do corante e, para controle, placas sem o resíduo.

A finalização do experimento foi feita de forma individualizada: quando cada micélio estivesse na eminência de atingir a borda da placa ou quando não fosse observado crescimento entre as observações diárias (KANG *et al.* 2014).

A velocidade do crescimento radial foi calculada a partir da média dos raios, medidos com um paquímetro digital, a partir da extremidade do inóculo até a extremidade do micélio (COLLA *et al.* 2008; FAN; SOCCOL, 2001), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Esquematização do traçado para a medição do crescimento radial (R = raio).



Fonte: COLLA *et al.* 2008; FAN; SOCCOL, 2001

A velocidade de crescimento foi determinada pela divisão da média dos raios pelo tempo do experimento, fornecendo o resultado em mm/dia.

Os resultados foram analisados estatisticamente, por análise de desvio padrão e teste t de Student, usando o software Software Statistica 13.2.

Na análise estatística, o teste t para amostras independentes (caso desse estudo) tem dois pressupostos: os dados devem seguir uma distribuição normal e as variâncias devem ser homogêneas (FEUR, 2017); ambos pressupostos foram confirmados através dos testes de Shapiro Wilk e Teste F, respectivamente, realizados com o Software Statistica 13.2.

5.4 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO

O objetivo deste estudo foi de especificar a melhor concentração para os fungos serem cultivados em meio líquido. Para isso foi feito o cultivo em placas de Petri contendo meio ABD e com concentrações de RPCG de (%): 6,25, 12,5, 25, e 50, seguindo o mesmo procedimento de preparo, inoculação, cultivo e análise dos dados descrito no item 5.3.

5.5 ESTUDO 3 - BIODEGRADACAO FÚNGICA EM CULTIVO LÍQUIDO

Nesta etapa foi feito um delineamento experimental fatorial completo (2^3), cultivando o fungo que apresentou melhores resultados no estudo 2, buscando a otimização de algumas condições para a degradação do corante (Tabela 1).

O fungo foi inoculado em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, conforme descrito no item 5.2. A concentração do corante escolhida foi de 12,5% considerando os resultados do segundo estudo (item 5.4).

Tabela 1 - Otimização da degradação de resíduos de coloração de Gram - Variáveis níveis de estudo e matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (n=2; $\alpha = 0,05$)

Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
Casca de Arroz	Sem	Com
Glicose (g/L)	10	20
Agitação (120 rpm)	Sem	Com

Níveis/ ensaios	Casca de Arroz	Glicose	Agitação	Respostas
1	-	-	-	Remoção da cor e Remoção de fenóis
2	+	-	-	
3	-	+	-	
4	+	+	-	
5	-	-	+	
6	+	-	+	
7	-	+	+	
8	+	+	+	

O experimento foi conduzido em duplicata, com os frascos cultivados em agitador orbital rotativo (*shaker*) em 120 rpm a 28°C (cultivo sob agitação) ou em estufa na mesma temperatura (cultivo estático), por 10 dias, conforme Tabela 1.

As análises de remoção da cor, de quantificação de fenóis e adsorção de corante no micélio estão descritas nos itens 5.7.1, 5.7.2 e 5.7.3, respectivamente. Os dados foram analisados estatisticamente através do Software Statistica 13.2.

5.6 ESTUDO 4 – ESTUDO CINÉTICO DA BIODEGRADAÇÃO

O cultivo foi conduzido por 14 dias em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo com 12,5% de resíduo de corante e 20 g/L de glicose, em estufa a 28°C, em duplicata e com frasco controle (sem adição do microrganismo). Como inóculo foram utilizados 5 plugs em cada frasco, obtidos conforme descrito em 5.2.

As amostragens foram feitas retirando-se uma duplicata (dois frascos) do cultivo submerso, nos dias 3, 5, 7, 10, 12, 14 do experimento.

Ao serem coletadas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por quinze minutos (ALMEIDA, 2013), antes de serem analisadas. Os seguintes acompanhamentos foram efetuados: remoção de cor (item 5.7.1), quantificação de fenólicos (item 5.7.2), adsorção de corante no micélio (item 5.7.3), determinação de açúcares redutores (item 5.7.4) e análises enzimáticas (item 5.7.5); em todas essas análises foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis, modelo Cary - Win 50, utilizando cubeta de quartzo (10 mm), na faixa espectrofotométrica de 190 – 780 nm.

5.7 ANÁLISES

5.7.1 Remoção da Cor

A remoção de cor das amostras e seus respectivos controles foram analisados pelo método scan, em espectrofotômetro UV- VIS modelo Cary-win 50, utilizando cubeta de quartzo (10 mm), e foi avaliada através da leitura e comparação das absorbâncias na faixa espectrofotométrica de 380-780 nm.

5.7.2 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

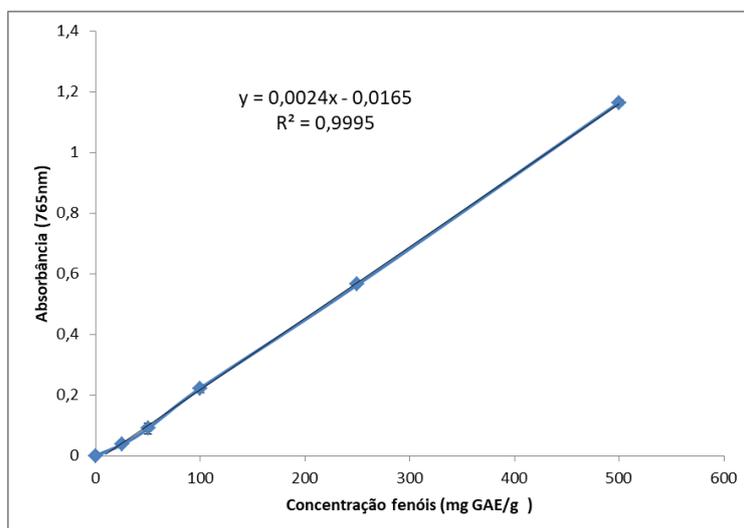
Os compostos fenólicos totais foram estimados nas amostras em triplicata, através da metodologia de Singleton, Joseph e Rossi (1965) a 765 nm, utilizando o método de Folin- Ciocalteau, tendo ácido gálico como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

5.7.2.1 Preparo dos Padrões de Ácido Gálico

Para o preparo da curva padrão de ácido gálico foram dissolvidos 0,5 g em 10 mL de etanol P.A (Padrão Analítico), num balão volumétrico de 100 mL; em seguida, o volume foi completado com água destilada, obtendo-se uma solução com a concentração de 5 g/L. Dessa solução foram retirados volumes de (mL): 0,5, 1, 2, 5 e 10, transferidos para balões volumétricos de 100 mL, sendo novamente o volume completado com água destilada, resultando em padrões de (mg/L): 25, 50, 100, 250 e 500, respectivamente (SINGLETON; JOSEPH; ROSSI, 1965). O experimento foi realizado em triplicata.

Para preparo da curva padrão (Figura 5) foram pipetados para balões volumétricos de 25 mL: 12,5 mL de água, 0,25 mL de ácido gálico, 1,25 mL do reagente de Folin. Deixou-se repousar a solução por 3 min, acrescentou-se 5 mL de solução de carbonato de sódio (75 g/L, preparada conforme descrito no item 5.7.2.2) e por fim completou-se o volume restante do balão com água destilada. Os balões volumétricos foram colocados em local escuro por 2 h. Ao fim do período as absorvâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro a 765 nm (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

Figura 5 - Curva padrão de Ácido Gálico usada para os cálculos de fenólicos totais.



5.7.2.2 Método de Folin – Ciocalteau

Para esta metodologia primeiramente foi preparada uma solução de carbonato de sódio 75 g/L da seguinte forma: pesou-se 37,5 g de carbonato de sódio anidro e transferiu-se para uma béquer de 1 L contendo 200 mL de água destilada. Em seguida o béquer foi colocado no forno micro-ondas e aquecido até fervura; nesse momento o micro-ondas foi pausado por 30 s e então continuou-se o aquecimento por mais 20 s, esse ciclo foi repetido cinco vezes, até que todo o carbonato de sódio fosse solubilizado. O béquer foi retirado do micro-ondas e deixado para resfriar na temperatura ambiente e em banho de água por duas horas, até que o equilíbrio térmico fosse atingido (temperatura ambiente). A solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, o volume foi completado com água destilada e a solução foi estocada em geladeira por no mínimo 15 h. Por fim a solução foi filtrada usando filtro de papel qualitativo, sendo o filtrado recolhido e guardado em temperatura ambiente (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

Para determinar a quantificação de compostos fenólicos totais, foram pipetados para balões volumétricos de 25 mL: 12,5 mL de água destilada, 0,25 mL do volume da amostra diluída e 1,25 mL do reagente de Folin. Deixou-se repousar a solução por 3 min, acrescentou-se o volume restante do balão com água destilada. Ao término, os balões foram colocados em local escuro por 2 h. Ao fim do período as absorbâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro a 765 nm (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

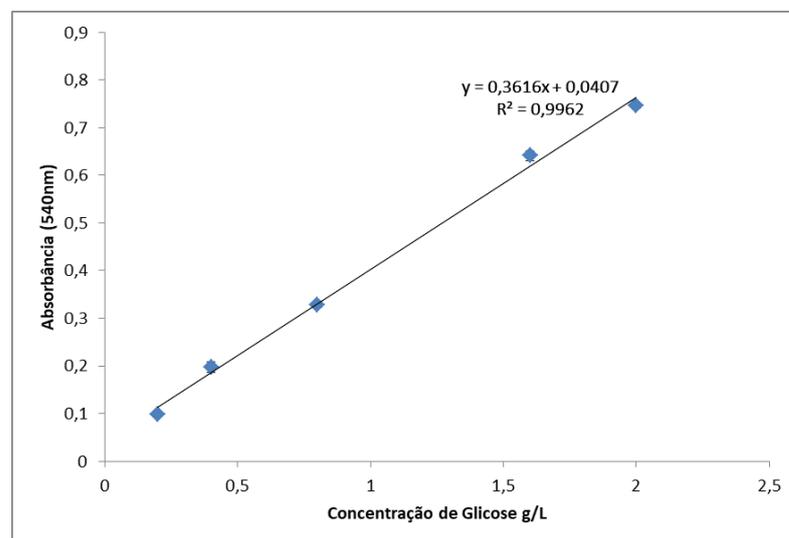
5.7.3 Teste de Adsorção do Corante no Micélio

Depois da centrifugação das amostras a biomassa dos experimentos 3 e 4 foi congelada para posterior realização do teste de dessorção. Os pellets foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de soluções de NaOH (0,01M), que foi utilizado no experimento 3, ou metanol, usado no experimento 4. Os pellets foram deixados sob agitação a 120 rpm em 30°C por 24 h; após este período analisou-se a dessorção po UV-vis nos comprimentos de onda entre 380 a 780 nm (XIN; CHENG; ZHENG, 2010).

5.7.4 Determinação de Açúcares Redutores

Para preparo da curva padrão de glicose (Figura 6) foi dissolvido 1 g de glicose em 500 mL de água destilada para obtenção de uma solução de 2 g/L. Dessa solução foram retirados volumes de (mL): 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 e transferido para tubos de ensaio. Foram acrescentados água destilada a cada tubo de ensaio respectivamente (mL): 1,4, 1,3, 1,1, 0,7 e 0,5. A todos os volumes foram acrescentados 1,0 mL do reativo DNS após os tubos foram aquecidos em banho-maria fervente por 5 min, os tubos foram resfriados e adicionados, a cada tubo, 7,5 mL de água destilada. Ao fim as soluções foram medidas em espectrofotômetro a 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata (MILLER, 1959).

Figure 6 - Curva padrão Glicose



Para determinação de açúcares redutores durante a cinética, foram pipetados em tubos de ensaio: 0,2 mL da amostra, 1,3 mL de água destilada e 1,0 mL do reativo DNS, seguindo-se o procedimento da curva padrão (MILLER, 1959).

5.7.5 Determinação da atividade de Lacase, MnP e LiP

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm, através do acompanhamento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,55 mL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 300 µL de ABTS (10 mM). Os tubos foram colocados em banho termostático a 40°C, e a reação teve seu início pela adição de 150 µL do extrato enzimático. A quantificação de lacase foi realizada no quinto minuto, quando a solução foi transferida para cubeta de quartzo e realizada a medição.

Para a medição da atividade de Manganês Peroxidase adicionou-se em tubos de ensaio pequeno 2,1 mL de tampão malonato (50 mM, pH 5,0), 300 µL da solução de MnSO₄ (10 mM) e 300 µL de extrato enzimático filtrado. Transferiu-se a mistura para uma cubeta de quartzo e adicionou-se 300 µL da solução de H₂O₂ (0,5 mM) (iniciando a ação da MnP). Muito rapidamente tampou-se a cubeta e homogeneizou-se a solução para inserir no UV-Vis. Zerou-se a linha de base do equipamento (com a própria amostra, segundos antes da leitura) e após a mensagem "Zeroed" iniciou-se a leitura de absorbância no modo Kinectis a 270 nm durante 1 ou 5 min.

A atividade da enzima LiP foi determinada espectrofotometricamente a 651nm pela oxidação do Azure B . Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de tampão tartarato de sódio (125 mM, pH 3), 500 µL de Azure B (0,160 mM) e 500 µL d extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de H₂O₂ (2 mM), e acompanhada por 5 minutos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO 1 - EFEITO DA PRESENÇA DE NUTRIENTES NA DEGRADAÇÃO DO CORANTE

No primeiro experimento os basidiomicetos foram expostos a meios sem nutrientes (Ágar) e meios mais completos (ABD) adicionados ou não da mistura de corantes (6,25%). O objetivo foi verificar se os fungos conseguiriam crescer e romper o grupo cromóforo dos corantes, o que foi mensurado através da velocidade de crescimento e da remoção da cor, respectivamente.

Os resultados indicados na Tabela 2 foram compilados para facilitar a comparação do efeito que a mistura de corantes exerceu sobre a velocidade do crescimento fúngico, em meios com maior ou menor quantidade de nutrientes.

Tabela 2 - Velocidade de crescimento fúngico, medida durante cultivo em placas de Petri, a 28°C, em meios com e sem resíduo de corantes de coloração de Gram na concentração de 6,25%. (n=4) (continua)

Basidiomiceto	Meio de cultivo	Velocidade de crescimento (mm/dia)		Teste t
		Média	DP	
<i>Ganoderma</i> sp	Ágar	4,29	0,58	a
	Ágar com corante	2,24	0,21	
	ABD	4,05	0,41	a
	ABD com corante	3,18	0,46	
<i>Pleurotus djamor</i>	Ágar	5,04	0,27	b
	Ágar com corante	4,93	0,49	
	ABD	4,57	1,17	b
	ABD com corante	5,61	0,38	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ágar	5,25	0,51	a
	Ágar com corante	3,68	0,32	
	ABD	5,97	1,58	b
	ABD com corante	5,53	0,55	
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Ágar	1,74	0,60	a
	Ágar com corante	2,62	0,15	
	ABD	3,22	0,26	b
	ABD com corante	3,49	0,13	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ágar	Sem crescimento		-
	Ágar com corante	Sem crescimento	-	
	ABD	3,18	0,31	b
ABD com corante	3,15	0,16		

Tabela 2 - Velocidade de crescimento fúngico, medida durante cultivo em placas de Petri, a 28°C, em meios com e sem resíduo de corantes de coloração de Gram na concentração de 6,25%. (n=4) (conclusão)

Basidiomiceto	Meio de cultivo	Velocidade de crescimento (mm/dia)		Test t
		Média	DP	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Ágar	4,34	0,29	b
	Ágar com corante	4,09	0,27	
	ABD	4,63	1,54	b
	ABD com corante	5,79	0,72	
<i>Trametes sp</i>	Ágar	2,72	0,08	a
	Ágar com corante	2,22	0,23	
	ABD	3,47	0,88	b
	ABD com corante	3,03	0,14	
Fungo isolado CF - LMB	Ágar	5,60	0,46	-
	Ágar com corante	Sem crescimento	-	
	ABD	4,35	0,47	a
	ABD com corante	5,37	0,23	
Fungo isolado CP - LMB	Ágar	4,68	0,46	a
	Ágar com corante	2,05	0,21	
	ABD	5,63	0,52	b
	ABD com corante	4,57	0,34	

ABD = agar batata dextrose; a = existe diferença estatística entre as amostras, b = não existe diferença estatística entre as amostras.

Foi interessante observar o crescimento dos fungos nos meios com maior ou menor quantidade de nutrientes, na presença do RPCG, indicando que o corante não deve ter sido tóxico para os microrganismos nessa concentração. A exceção foi *Phanerochaete chrysosporium*, que não apresentou crescimento nas placas com ágar e ágar com corante. Como os resultados do *P. chrysosporium* deixaram dúvida, para a continuidade do trabalho uma nova cepa foi adquirida do Instituto André Tosello, em Campinas.

Através dos dados estatísticos foi interessante observar que em sete das amostras houve diferença na velocidade de crescimento micelial e em oito não houve. O corante inibiu a velocidade de crescimento e, portanto, apresentou toxicidade para alguns fungos, em meios sem nutrientes, sendo eles: *Ganoderma sp.*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes sp* e o Fungo isolado CP - LMB.

Com exceção do *Ganoderma sp.*, o cultivo desses fungos num meio com mais nutriente (ABD) permitiu que eles se tornassem mais tolerantes à presença do corante, visto que não houve inibição na velocidade de crescimento. Surpreendentemente em dois casos o corante estimulou o

crescimento microbiano: em *Pleurotus sajor caju* cultivado em ágar e *P. djamor* cultivado em ABD.

Os resultados sinalizaram a necessidade da utilização de meios nutricionalmente mais enriquecidos (por ex. ABD) nos estudos posteriores de biodegradação dos corantes. Essa resposta foi analisada tanto através da velocidade de crescimento do fungo, quanto pelo rompimento do grupo cromóforo (descoloração do meio), conforme indicado na Tabela 3.

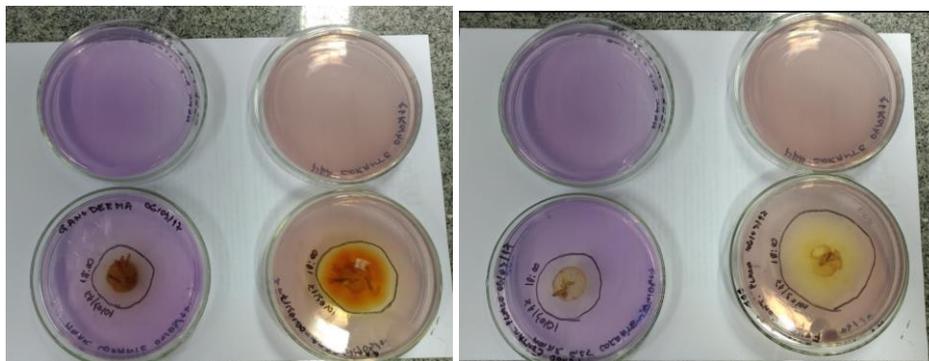
Tabela 3 - Comparação da velocidade de crescimento fúngico e da descoloração dos meios contendo 6,25% de corantes residuais da coloração de Gram (cultivo em placas de Petri, a 28°C).

Basidiomiceto	Meio de cultivo	Velocidade de crescimento (mm/dia)		Test t	Descoloração
		Média	DP		
<i>Ganoderma</i> sp	Ágar com corante	2,24	0,21	a	++
	ABD com corante	3,18	0,46		+++
<i>Pleurotus djamor</i>	Ágar com corante	4,93	0,49	b	nd
	ABD com corante	5,61	0,38		+
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ágar com corante	3,68	0,32	a	nd
	ABD com corante	5,53	0,55		+++
<i>Pleurotus sajor caju</i>	Ágar com corante	2,62	0,15	a	+
	ABD com corante	3,49	0,13		+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ágar com corante	-	-	-	nd
	ABD com corante	3,15	0,16		++
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Ágar com corante	4,09	0,27	a	+
	ABD com corante	5,79	0,72		++
<i>Trametes</i> sp	Ágar com corante	2,22	0,23	a	++
	ABD com corante	3,03	0,14		++
Fungo isolado CF - LMB = Casca feia	Ágar com corante	-	-	-	+
	ABD com corante	5,37	0,23		++
Fungo isolado CP - LMB = Contaminação	Ágar com corante	2,05	0,21	a	+++
	ABD com corante	4,57	0,34		+++

ABD = ágar batata dextrose; a = existe diferença estatística entre as amostras, b = não existe diferença estatística entre as amostras; +++ = descoloração total do meio; ++ = descoloração parcial do meio (cerca de 50%); + = descoloração pequena do meio (cerca de 20%); nd = não descoloriu

Os fungos que apresentaram melhores resultados em relação à descoloração e crescimento neste estudo foram: *Ganoderma* sp, *Pleurotus ostreatus* e Fungo isolado CP - LMB = Contaminação, obtendo crescimento e degradação eficiente como pode ser observada também na Figura 7.

Figura 7 - Fotografia com a verificação da descoloração dos meios de cultivo contendo 6,25% de resíduo de coloração de Gram, após 4 dias de cultivo a 28°C.



Ganoderma sp. 4 dias de cultivo Fungo Isolado CP 4 dias de cultivo



P. ostreatus 4 dia de cultivo

Os dados na Tabela 3 mostram que alguns fungos apresentaram degradação parcial do corante, apesar de terem elevado valor de velocidade de crescimento; entre eles: *Pleurotus djamor*, *Pycnoporus sanguineus* e Fungo isolado CF. Isso mostra que não há correlação entre a velocidade de crescimento e a degradação do corante, por isso para trabalhos futuros recomenda-se que não seja feito o estudo do crescimento micelial num sentido quantitativo, mas somente numa escolha qualitativa.

Segundo a Tabela 3, com exceção do *Pleurotus djamor*, todos os fungos apresentaram diferenças estatísticas na velocidade de crescimento em virtude da variação dos meios, sendo melhores resultados obtidos naqueles com mais nutrientes. O fungo que se destacou neste experimento foi o *P. ostreatus*,

porque a partir do quarto dia de cultivo descoloriu o corante totalmente, com um crescimento radial micelial de 5,53 mm/dia.

Kunjadia *et al.* (2016) reconhecem a competência dos fungos da podridão branca na descoloração de corantes e estabelecem as bases para a sua aplicação na degradação do corante. Em seu estudo, centra-se na exploração da eficiência de degradação de corantes de três diferentes *Pleurotus* sp. em concentrações de (mg/L): 20, 50, 100 e 200 dos corantes *Golden Yellow*, vermelho escuro e coral azul marinho.

Verificou-se que *P. ostreatus*, *P. sapidus* e *P. florida* a 20 mg/L de concentração de corante mostram 88, 92 e 98% de descoloração, respectivamente, para os três corantes (KUNJADIA *et al.*, 2016).

6.2 ESTUDO 2 - AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO CORANTE SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO

O principal objetivo deste estudo foi observar, dentro de determinadas faixas de concentração do corante, qual valor inibia a ação microbiana, para definir uma condição para o estudo em meio líquido. Nesse sentido, os fungos foram submetidos às concentrações de corante de (%): 6,25, 12,5, 25 e 50, em placas de Petri contendo meio ABD, com resultados indicados na Tabela 4.

Tabela 4 - Velocidade de crescimento fúngico, observada durante cultivo em placas de Petri em 28°C, em ágar batata dextrose adicionado de diferentes concentrações do resíduo de corantes de coloração de Gram (n=8) (continua)

Basidiomiceto	Concentração de corante no meio (%)	Velocidade de crescimento (mm/dia)		Test t	Descoloração
		Média	Desvio Padrão		
<i>Ganoderma</i> sp	50	-	-	-	Nd
	25	2,10	0,25	-	+
	12,5	2,40	0,24	b	++
	6,25	3,43	0,38	c	+++
<i>Pleurotus djamor</i>	50	-	-	-	Nd
	25	-	-	-	Nd
	12,5	1,98	0,42	-	+
	6,25	2,78	0,81	c	++

Tabela 4 - Velocidade de crescimento fúngico, observada durante cultivo em placas de Petri em 28°C, em ágar batata dextrose adicionado de diferentes concentrações do resíduo de corantes de coloração de Gram (n=8) (conclusão)

<i>Basidiomiceto</i>	Concentração de corante no meio (%)	Velocidade de crescimento (mm/dia)	Desvio Padrao	Test t	Descoloração
<i>Pleurotus ostreatus</i>	50	1,20	0,38		Nd
	25	1,62	0,25	a	+
	12,5	5,70	0,77	b	+++
	6,25	5,28	0,25	sde	+++
<i>Pleurotus sajor caju</i>	50	-	-	-	Nd
	25	-	-	-	Nd
	12,5	-	-	-	+
	6,25	3,81	1,82	-	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	50	1,29	0,22		Nd
	25	2,09	0,44	a	Nd
	12,5	5,63	0,56	b	+
	6,25	5,51	0,62	sde	++
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	50	1,30	0,41		Nd
	25	2,70	0,32	a	+
	12,5	5,19	0,35	b	++
	6,25	5,26	0,84	sde	+++
<i>Trametes sp</i>	50	-	-		Nd
	25	1,29	0,47	-	+
	12,5	2,70	0,51	b	++
	6,25	4,35	1,07	c	+++
Fungo isolado CF - LMB	50	-	-		Nd
	25	-	-	-	+
	12,5	2,11	0,45	-	++
	6,25	3,71	0,61	c	+++
Fungo isolado CP - LMB	50	1,88	0,71		Nd
	25	1,63	0,45	sde	++
	12,5	3,66	0,29	b	+++
	6,25	4,46	0,61	c	+++

a = existe diferença estatística entre as amostras com 50 e 25%; **b** = existe diferença estatística entre as amostras de 25 e 12,5%; **c** = existe diferença estatística entre as amostras de 12,5% e 6,25%; **sde** = sem diferença estatística; **+++** = descoloração total do meio; **++** = descoloração parcial do meio (cerca de 50%); **+** = descoloração pequena do meio (cerca de 20%); **nd** = não descoloriu.

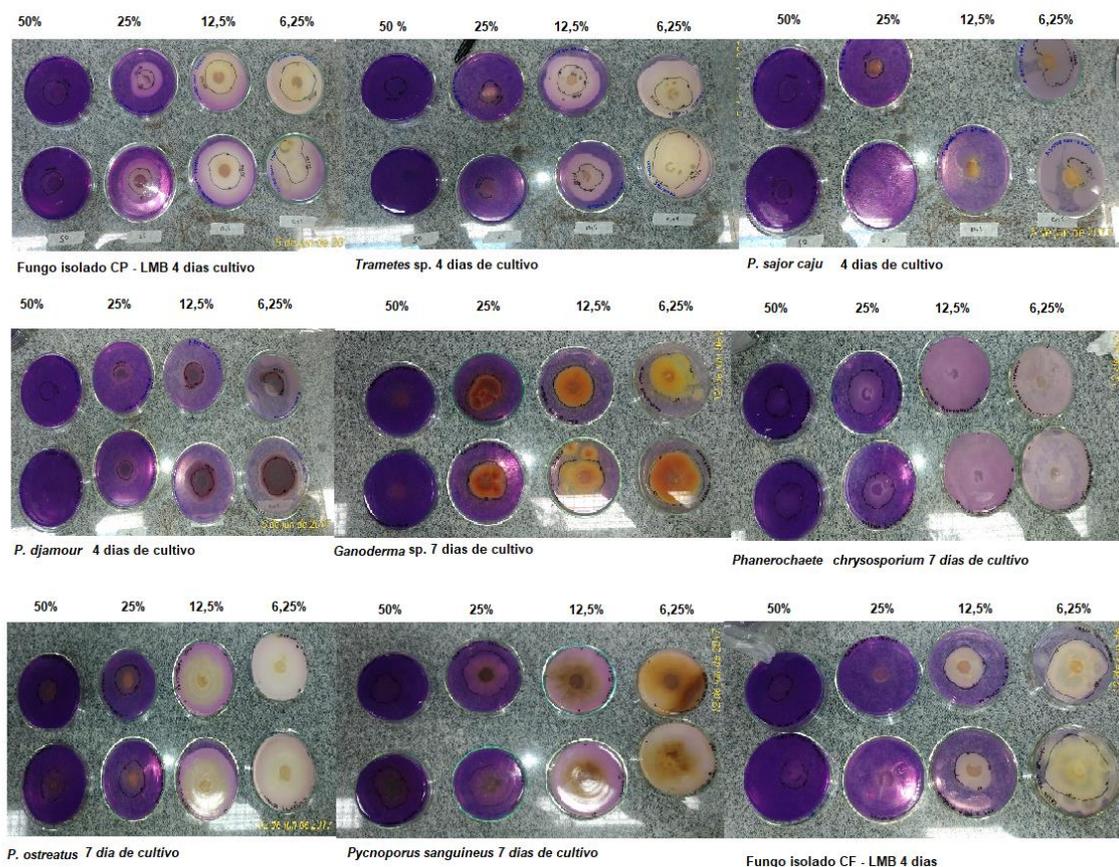
Como pode ser observado na Tabela 4 apenas três basidiomicetos apresentaram diferenças estatísticas entre as diluições 50% e 25%; entre 25% e 12,5% 5 fungos mostraram divergências e 5 tiveram desigualdades entre 12,5% e 6,25%.

Para *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete* e *Pycnoporus* o aumento na concentração do corante de 6,25% para 12,5% não apresentou diferença na

velocidade de crescimento, provavelmente por maior tolerância fúngica ao corante. Nas demais condições, para todos os fungos o aumento na concentração do corante afetou o crescimento, destacando a toxicidade do resíduo estudado. Mesmo diluindo o efluente uma vez (concentração de 50%) nenhum microrganismo degradou o corante e poucos cresceram (*P. ostreatus*, *Phanerochaete*, *Pycnoporus*, Fungo isolado CP).

Os fungos que cresceram (Tabela 4) em concentrações mais elevadas, em sua maioria, também degradaram o corante o que pode ser verificado na Figura 8.

Figure 8 - Fotografias das placas de Petri com os cultivos do Estudo 2, após 4 ou 7 dias de crescimento de *Pleurotus ostreatus*, a 28°C, em meio ABD com diferentes concentrações de resíduo de corantes de Gram



Em quase todas as placas que continham o resíduo do corante diluído em 50 % não foi observada a descoloração o que já era esperado, pois em muitas também não ocorreu o crescimento micelial.

Para a concentração 25% apenas *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp e Fungo isolado CP – LMB apresentaram uma pequena descoloração. Em 12,5% e 6,25% a remoção da cor ocorreu em quase todos os fungos exceto o *Pleurotus sajor caju*.

Utilizando o *Pleurotus sajor caju*, Souza (2009) observou que o corante na diluição de 12,5% apresentou uma maior eficiência na degradação de cor e Nozu e Saldanha (2007) conclui que, em termos de proporcionalidade, a biodegradação teve maior efeito na concentração 12,5%.

Kunjadia *et al.* (2012) estudaram o efeito da concentração sobre o crescimento do *P. ostreatus*, utilizaram concentrações do corante cristal violeta em mg/L de : 20, 50, 100 e 200 e verificaram que o crescimento micelial do *Pleurotus ostreatus* diminuía conforme aumentava a concentração do corante.

O fungo *P. ostreatus* foi escolhido para continuidade do trabalho em meio líquido, pois auferiu resultados interessantes na descoloração em quase todas as diluições, exceto na de 50%, além de obter um melhor crescimento médio (5,7 mm/dia) entre os fungos estudados em concentração de 12,5% o que também motivou a escolha da concentração, pois esta foi a diluição que pareceu mais favorável para o fungo.

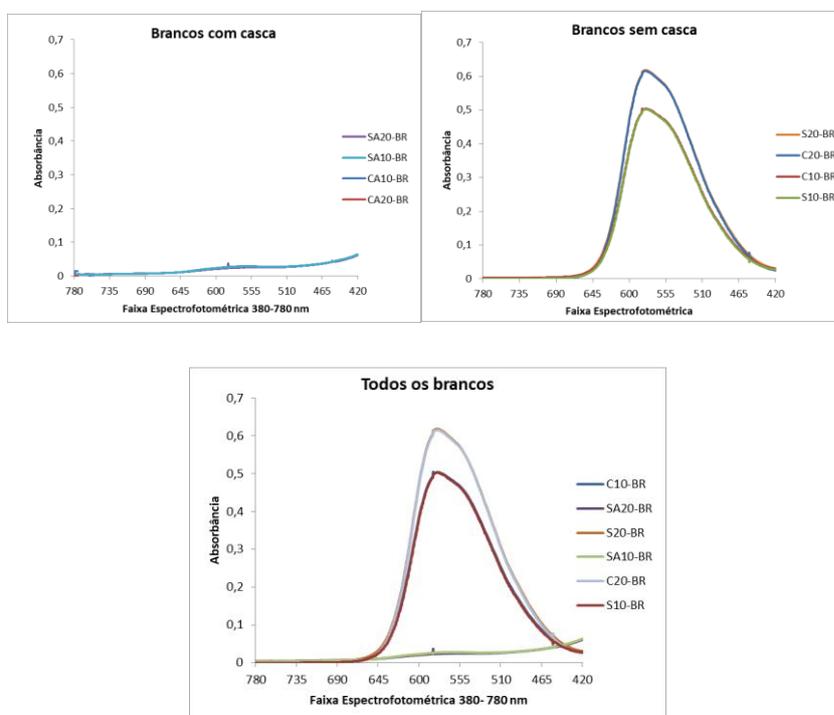
6.3 ESTUDO 3 - BIODEGRADACAO FÚNGICA EM CULTIVO LÍQUIDO

O estudo em questão teve como objetivo avaliar a melhor condição em cultivo líquido considerando variáveis como: adição de casca de arroz, agitação e aumento de glicose e foi observado o efeito sobre a degradação de grupos cromóforos e fenóis.

6.3.1 Degradação da Cor

Ao final do cultivo foi observado que a casca de arroz apresentou elevada capacidade de adsorção dos corantes, pois os frascos controle com sua adição apresentavam elevada descoloração (média das absorvâncias $0,0264 \pm 0,008$, $n=4$), comparados com aqueles sem adição de casca (média das absorvâncias $0,560 \pm 0,066$, $n=4$). Por isso todos os cálculos de descoloração dos meios foram feitos considerando a média obtida nos controles sem adição de casca. A descoloração dos brancos dos experimentos pode ser verificada na Figura 9 dos gráficos das varreduras.

Figure 9 - Espectro de varredura dos brancos do Estudo 3, comparando controles com e sem adição de casca de arroz



Legenda: SA10-BR= Branco do experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. SA20 – BR = Branco sem agitação com adição de casca de arroz e 20 g/L de glicose, S10-BR = Branco sem agitação sem adição de casca de arroz com 10 g/L de glicose, S20-BR= Branco sem agitação, sem adição de casca de arroz com 20 g/L de glicose. C10A-BR =Branco do experimento com agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. C20A- BR =Branco, com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose, C10-BR= Branco com agitação, sem adição de casca de arroz e com 10 g/L de glicose. C20-BR Branco com agitação, sem adição de casca de arroz e com 20 g/L de glicose.

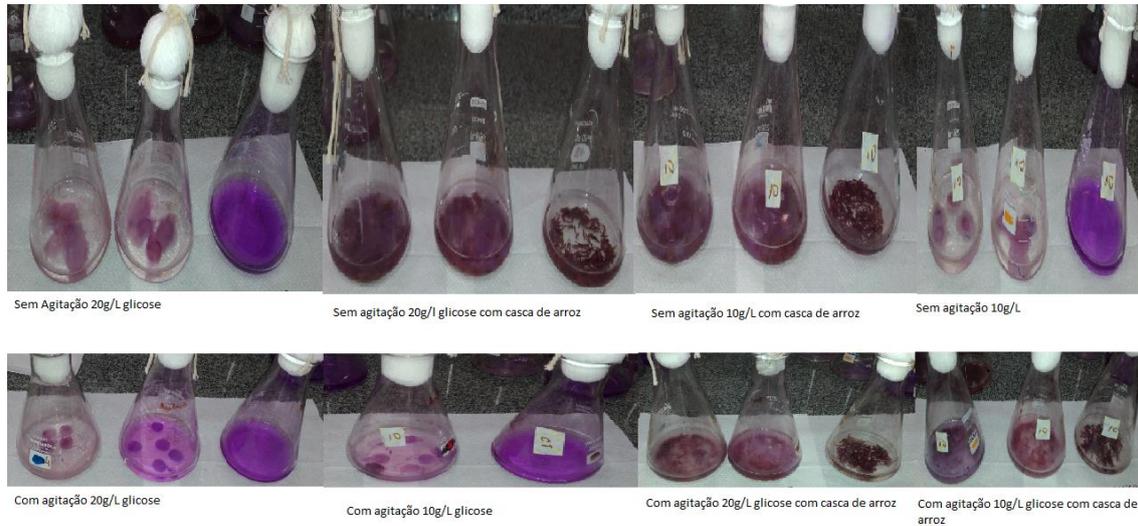
A adição da casca de arroz fez com que os resultados fossem bem interessantes. Verifica-se que com casca de arroz a descoloração é tão boa quanto o experimento com o basidiomiceto, devido à sua adsorção. Assim para trabalhos futuros seria interessante fazer um estudo de adsorção somente com casca de arroz antes do tratamento com o *P. ostreatus*.

A interação da ligação de hidrogênio entre grupos hidrofílicos, como carbonila, fenólico e grupos hidroxialifáticos a casca de arroz possui um grande potencial adsorvente (ZHANG *et al.*, 2016).

A casca de arroz atuou como adsorvente na remoção de cor e de fenóis deste trabalho e Zhang *et al.* (2016) observaram como o organosolvente de lignina (OL), subproduto da deslignificação da palha de arroz explodida a vapor, adsorveu o corante estudado. E embora a estrutura do organosolvente de lignina não tenha sido elucidada, geralmente é aceito que contém apenas grupos hidrofóbicos, como grupos aromáticos e alifáticos e também grupos hidrofílicos, como carbonila, fenólico e grupos hidroxialifáticos (EL HAGE *et al.*, 2009). Portanto as partículas de OL podem produzir forte força de adsorção por ligação de hidrogênio. A estrutura em forma de favo de mel pode facilitar a adsorção do corante (ZHANG *et al.*, 2016).

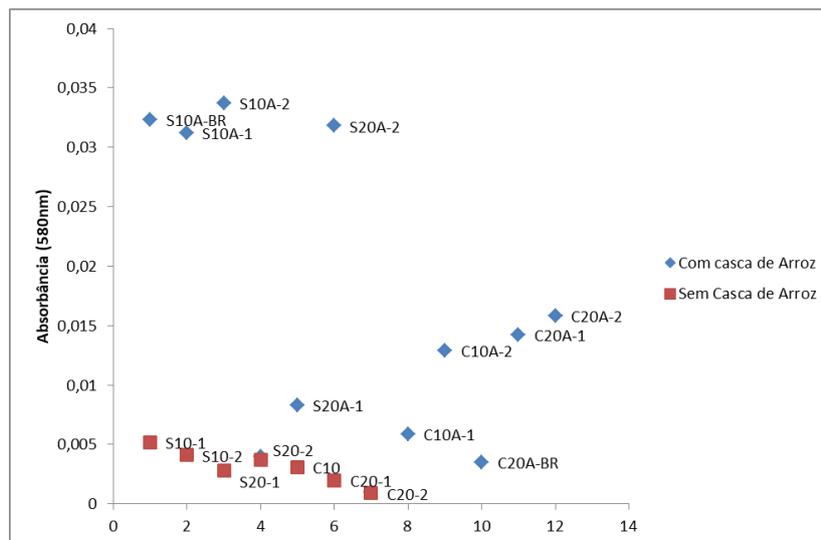
A remoção da cor no término dos experimentos pode ser observada na Figura 10, a qual evidencia que não só a casca adsorveu o corante, mas o fungo também.

Figura 10 - Fotografia do estudo 3 Biodegradação Fúngica em Cultivo Líquido, degradação de cor após 10 dias de cultivo com agitação e estático.



A análise de dessorção do corante do micélio e da casca não deu certo. Conforme pode ser observado na Figura 11, não foi possível remover o corante da biomassa por NaOH a 0,01 mol/L e também com adição de Metanol, o que pode estar relacionado à fortes ligações químicas, irreversíveis, entre o corante e grupos funcionais na superfície fúngica ou mesmo à bioacumulação. Provavelmente devido à resistência relativamente alta do fungo ao tratamento ácido ou alcalino o que torna-o eficiente e promissor candidato como adsorvente (CHAKRABORTY et al., 2013).

Figura 11 - Gráfico de desorção do corante (λ 580 nm) comparando estudos com e sem casca de arroz



Legenda: SA10-BR= Branco do experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. SA10-1= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1, SA10-2= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 2, S10-1= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1, S10-2= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 2, S20-1= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 1, S20-2= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 2, SA20 – BR = Branco sem agitação com adição de casca de arroz e 20 g/L de glicose, SA20-1= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 1, SA20-2= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 2 . C10A-BR =Branco do experimento com agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. C10A-1=experimento com agitação com adição de casca de arroz 10 g/L glicose amostra 1, C10A-2=experimento com agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 2, C10-1=experimento com agitação sem adição de casca de arroz com 10 g/L de glicose, C20-1=experimento com agitação sem adição de casca de arroz com 20 g/L de glicose amostra 1, C20-2=experimento com agitação sem adição de casca de arroz com 20 g/L de glicose amostra 2, C20A- BR =Branco, com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose, C20A- 1 = com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose amostra 1, C20A- 2= com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose amostra 2.

Por isso qualquer análise dos resultados em relação à remoção de cor deve ser muito cuidadosa, pois não aconteceu necessariamente a biodegradação do corante mas, sobretudo sua adsorção nos suportes presentes.

A alta utilidade das cepas de fungos nos processos de descoloração (por bioissorção e / ou biotransformação) e a diminuição da toxicidade do corante foi frequentemente provada (CHAKRABORTY *et al.*, 2013; PRZYSTAS; ZABLOCKA-GODLEWSKA; GRABINSKA-SOTA, 2015; XIN; CHEN; ZHENG, 2010).

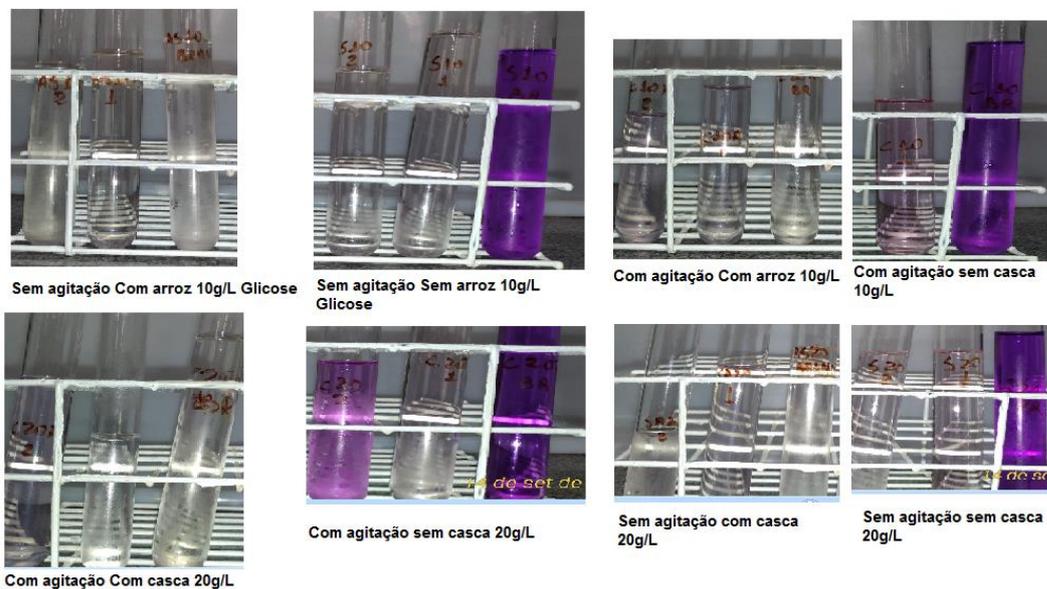
O resultado da análise da descoloração das amostras está indicado na Tabela 5:

Tabela 5 - Remoção de cor observada ($\lambda = 580$ nm) nos cultivos de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de coloração de Gram (12,5%), após 7 dias em 28°C (n=2).

Condição do teste			Média da Absorbância no final do experimento	Desvio Padrão	Descoloração (%) (Comparação controle abiótico absorbância (0,6184))
AGITAÇÃO	GLICOSE	CASCA			
COM	10	COM	0,101	0,009	82,0
COM	20	COM	0,114	0,014	79,8
COM	20	SEM	0,074	0,022	88,2
COM	10	SEM	0,062	-	87,8
SEM	10	SEM	0,044	0,036	92,2
SEM	20	SEM	0,020	0,001	96,5
SEM	10	COM	0,102	0,033	81,8
SEM	20	COM	0,052	0,049	90,7

Observando os resultados na Tabela 5 verifica-se que experimentos sem casca e sem agitação obtiveram resultados melhores de remoção de cor comparando com os com casca e com agitação. Os estudos com casca absorveram bastante corante, porém a melhor condição observada na Tabela 5 e confirmada através das análises estatísticas foi o experimento sem agitação com 20 g/L de glicose as descoloração observadas neste experimento pode ser verificada na Figura 12.

Figura 12 - Fotografia de amostras do Estudo 3, no final do cultivo de *Pleurotus ostreatus*, a 28°C, em meio contendo resíduo de corantes de coloração de Gram sob diferentes condições de agitação, concentração de glicose e adição de casca de arroz.



Observa-se que na Figura 12 que os experimentos com casca obtiveram boa descoloração inclusive do branco mostrando a adsorção já citada acima.

O resultado da ANOVA (*analysis of variance* ou análise de variância), mostrado na Tabela 6, indica que o fator que mais influenciou na remoção da cor foi a casca ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Análise de variância dos efeitos dos fatores sobre a remoção da cor (ou seja, degradação do grupo cromóforo) no meio de cultivo ($\alpha < 0,05$). (continua)

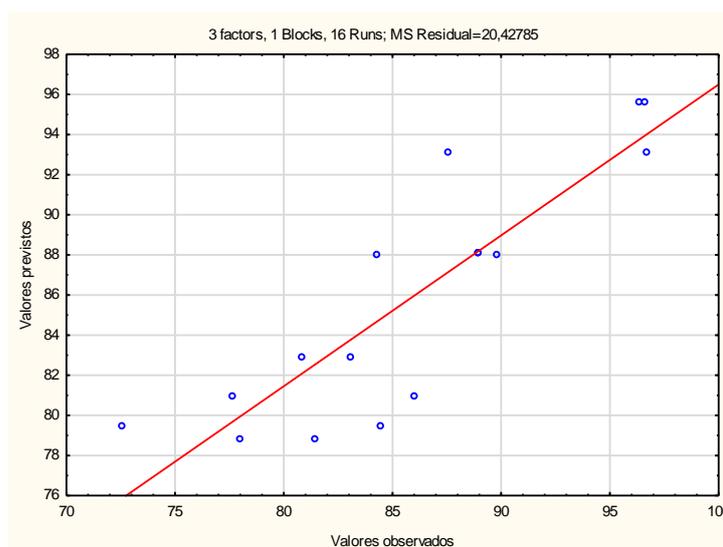
Fatores	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
(1)Agitacao(L)	31,6	1	31,6	1,549	0,245
(2)Glicose (L)	2,5	1	2,5	0,121	0,735
(3)Casca (L)	452,6	1	452,6	22,157	0,001

Tabela 6 - Análise de variância dos efeitos dos fatores sobre a remoção da cor (ou seja, degradação do grupo cromóforo) no meio de cultivo ($\alpha < 0,05$). (conclusão)

1L por 2L	6,9	1	6,9	0,337	0,576
1L por 3L	48,7	1	48,7	2,382	0,157
2L por 3L	15,8	1	15,8	0,773	0,402
Erro	183,9	9	20,4		
Total Soma Quadrados	741,9	15			

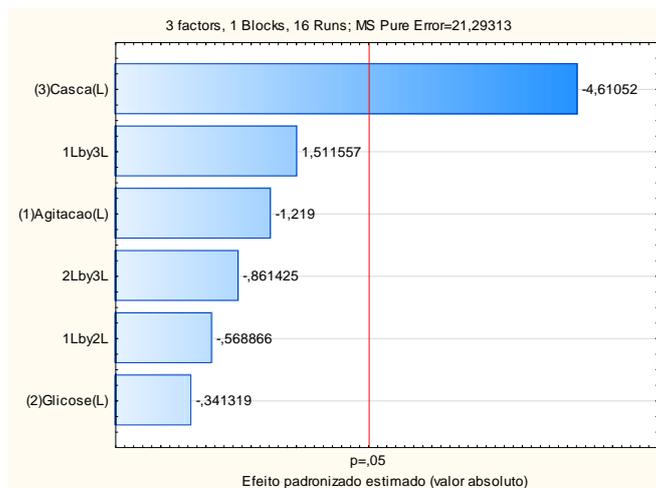
O gráfico da Figura 13 mostra que houve correlação entre o modelo matemático do teste e os dados obtidos. Isso indica que o modelo calculado possui boa qualidade de ajuste (ANOVA falta de ajuste, $p = 0,449$), prevendo corretamente os dados e não se distanciando de maneira significativa da reta de identidade.

Figura 13 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos no experimento 3, considerando a Remoção da Cor observada.



O diagrama de Pareto (Figura 14) mostra que a ausência da casca de arroz foi o efeito que mais influenciou positivamente nos resultados de remoção do corante (%).

Figura 14 - Diagrama de Pareto, com o efeito dos fatores na Remoção da Cor ($\alpha=0,05$).



A análise dos resultados através dos gráficos de superfície de resposta (Figura 15) indica que a melhor condição para a remoção da cor é obtida em cultivo sem agitação, sem adição de casca e com maior concentração de glicose (20 g/L). Por isso, essa foi a condição escolhida para o acompanhamento cinético do cultivo (estudo 4 - item 6.4).

Figure 15 - Gráficos de superfície de resposta, mostrando o efeito dos fatores agitação, adição de casca de arroz e concentração de glicose na remoção da cor dos cultivos ($\alpha=0,05$).

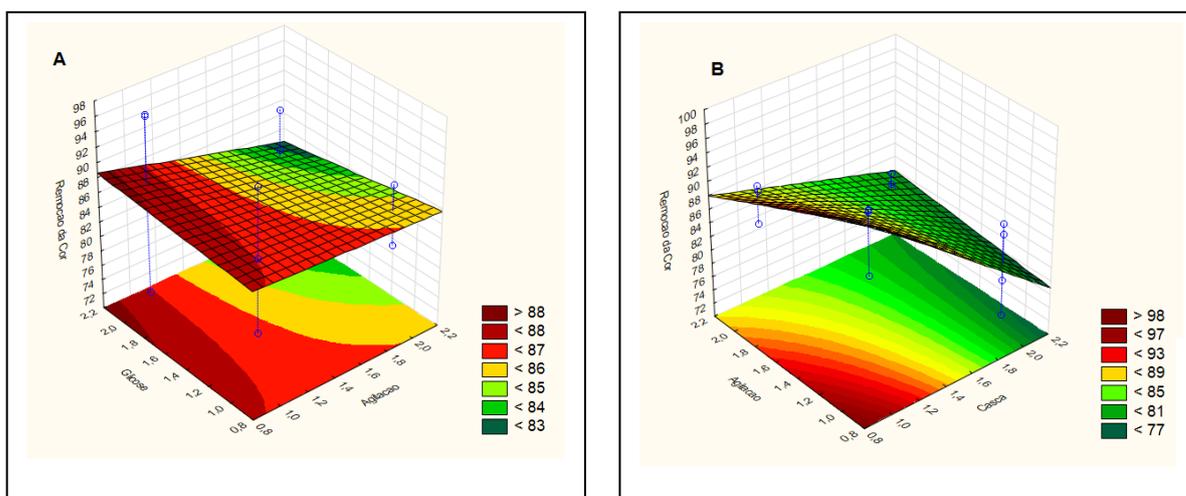
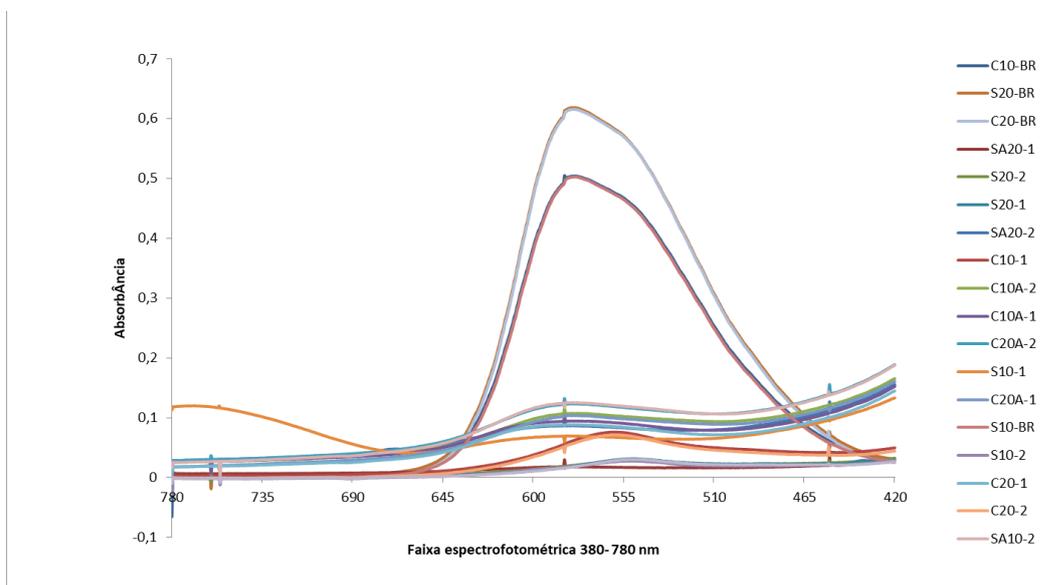


Figura 16 - Gráfico de varredura de cor com todos os estudos e suas variações.



Legenda: SA10-BR= Branco do experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. SA10-1= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1, SA10-2= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 2, SA20 – BR = Branco sem agitação com adição de casca de arroz e 20 g/L de glicose, SA20-1= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 1, SA20-2= experimento sem agitação com adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 2 . S10-BR= Branco do experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. S10- 1= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1. S10- 2= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 2. S20- BR= Branco do experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 20g/L de glicose. S20- 1= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 1, S20- 2= experimento sem agitação sem adição de casca de arroz e 20g/L de glicose amostra 2, C10-BR =Branco do experimento com agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. C10-1 =Branco do experimento com agitação sem adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1, C10A-BR =Branco do experimento com agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose. C10A-1=experimento com agitação com adição de casca de arroz e 10g/L de glicose amostra 1, C20- BR =Branco, com agitação, sem adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose, C20A- BR =Branco, com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose C20- 1 =com agitação, sem adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose, amostra 1, C20- 2 =com agitação, sem adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose, amostra 2, C20A- 1 = com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose amostra 1, C20A- 2= com agitação, com adição de casca de arroz, e 20 g/L de glicose amostra 2.

Na Figura 16 do gráfico de varredura nota-se a pequena diferença entre a descoloração do corante em todos os experimentos que também fica mensurada esta diferença entre os resultados de remoção de cor mostrados na Tabela 6, portanto a melhor condição observada neste estudo foi o ensaio sem agitação com 20 g/L de glicose (S20) escolhido pois não sofreu a interferência de adsorção da casca de arroz.

6.3.2 Degradação de fenólicos

A presença da casca de arroz também influenciou no resultado da quantidade de fenólicos nos meios de cultivo ao final do experimento, como observado para a coloração (discutido em 6.3.1). Os frascos controles sem casca apresentaram valores finais de fenólicos médios de $960,4 \pm 664,7$ mg/L ($n=4$), enquanto que aqueles com casca tinham $35,4 \pm 5,1$. Por essa razão, os cálculos de remoção de fenólicos foram feitos considerando o valor médio sem a casca.

A maior presença dos fenóis livres nos meios sem casca pode favorecer a biodegradação, pois Yan, Wang e Shang (2009) verificaram que a lacase é a principal enzima produzida por *P. ostreatus* e esta enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos.

A concentração final de fenólicos e a porcentagem de sua remoção nas amostras estão indicadas na Tabela 7. Os resultados dos experimentos sem agitação (tanto com ou sem casca e glicose 10 g/L e 20 g/L) parecem ter apresentado as melhores respostas de remoção de fenólicos; contudo, o resultado da ANOVA, mostrado na Tabela 8, indica que nenhum dos fatores estudados influenciou de maneira significativa na remoção dos compostos fenólicos ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Remoção de fenólicos observada nos cultivos de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de coloração de Gram (12,5%) , após 10 dias, em 28°C. (n=2)

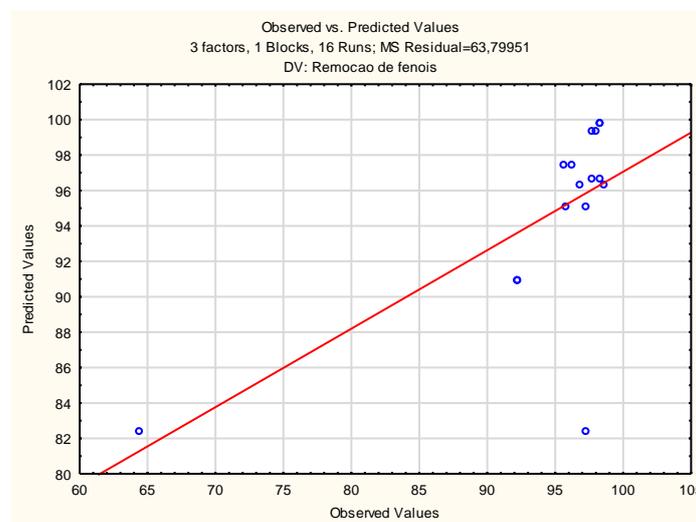
Condição do teste			Média da concentração fenólicos no final do experimento mg/L	Desvio Padrão	Remoção de Fenólicos (%)
AGITAÇÃO	GLICOSE	CASCA			
COM	10	COM	38,6	3,6	96,0
COM	20	COM	33,1	10,4	96,6
COM	20	SEM	183,2	222,7	80,9
COM	10	SEM	74,3	-	92,3
SEM	10	SEM	15,7	0,4	98,4
SEM	20	SEM	21,3	11,3	97,8
SEM	10	COM	19,0	3,4	98,0
SEM	20	COM	20,4	1,7	97,9

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos fatores sobre a concentração final de fenóis (ou seja, sua degradação) no meio de cultivo ($\alpha < 0,05$).

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
(1)Agitacao(L)	172,3	1	172,3	2,7	0,135
(2)Glicose (L)	33,9	1	33,9	0,5	0,484
(3)Casca (L)	91,7	1	91,7	1,4	0,261
1L por 2L	25,3	1	25,3	0,4	0,545
1L por 3L	95,6	1	95,6	1,5	0,252
2L por 3L	38,1	1	38,1	0,6	0,459
Erro	574,2	9	63,8		
Total Soma Quadrados	1031,0	15			

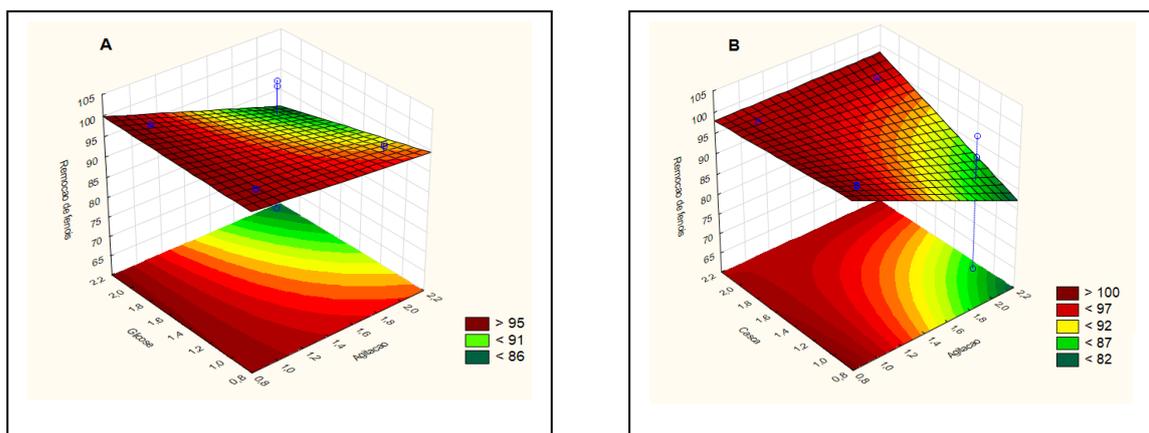
O gráfico da Figura 17 mostra que houve correlação entre o modelo matemático do teste e os dados obtidos (falta de ajuste $p = 0,502$); contudo, também indica a presença de um ponto *outlier* no dado de 97,3% de remoção de fenóis para o cultivo com agitação, glicose 20 g/L, sem casca.

Figura 17 - Gráfico dos valores observados e dos valores previstos no experimento 3, considerando a degradação de fenólicos do meio.



Já no gráfico de superfície de resposta (Figura 18) observa-se que a melhor condição para a degradação de fenóis deve ocorrer num cultivo sem agitação, com qualquer concentração de glicose (10 ou 20g com ou sem a adição de casca de arroz).

Figure 18 - Gráfico de superfície de resposta, mostrando o efeito dos fatores glicose e agitação na remoção de fenóis do meio de cultivo ($\alpha=0,05$).



Considerando os resultados das análises estatísticas para remoção de cor e de fenólicos, optou-se pelo acompanhamento cinético do cultivo de *Pleurotus ostreatus* em 12,5% de resíduo de coloração de Gram, adicionado de 20 g/L de glicose, sem agitação e sem adição de casca de arroz.

Kunjadia *et al.* (2012) e Rani *et al.* (2014) relataram atividade enzimática com *P. ostretus* em cultivo líquido sob agitação bem como o crescimento micelial em contrapartida Yan, Wang e Zhang (2009) e Gahlout, Gupte e Gupte (2013) observaram a enzima lacase e sua multiplicação em cultivo estático. Assim conclui-se que não há uma evidência que a agitação possa interferir no crescimento e atividade enzimática dos experimentos.

6.4 ESTUDO 4 – ESTUDO CINÉTICO DA BIODEGRADAÇÃO

Durante o acompanhamento do processo por 14 dias foi observado que a maior descoloração ocorreu até o terceiro dia (67%) (Figuras 19 e 20), permanecendo a cor do meio inalterada até o final do cultivo.

Figura 19 - Absorbância do meio de cultivo ao longo do tempo, durante estudo de biodegradação de corantes residuais da Coloração de Gram, por *Pleurotus ostreatus*, em cultivo submerso estático, a 28°C (em vermelho, valor inicial).

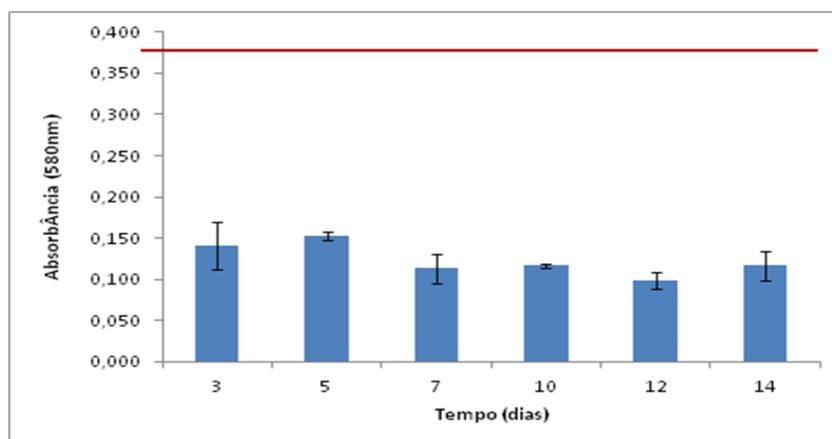
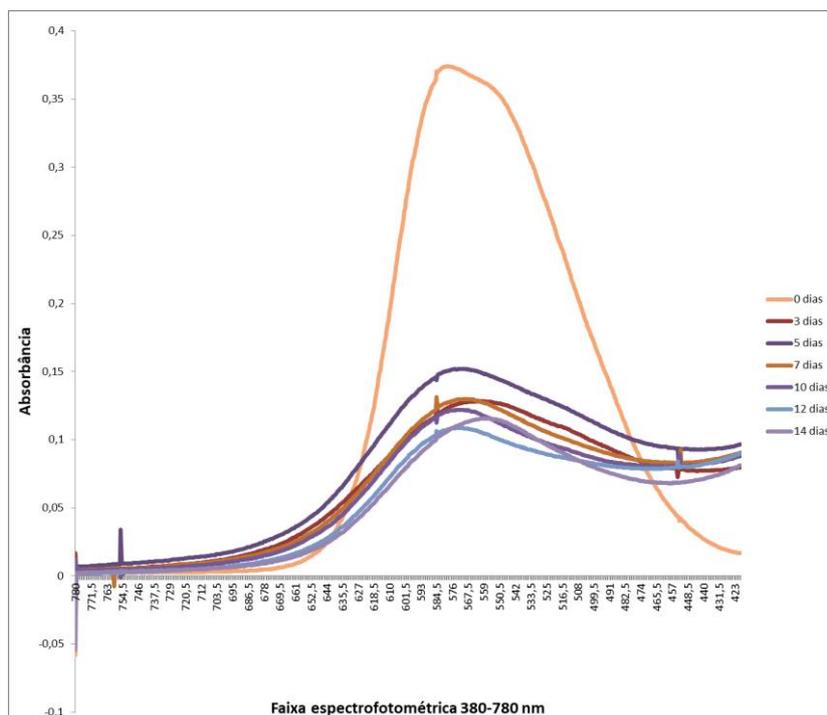
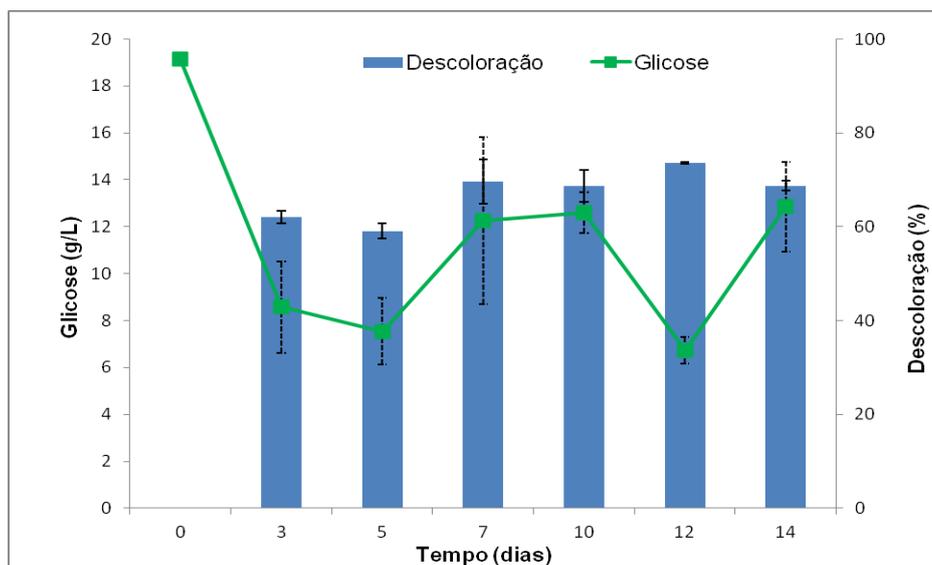


Figura 20 - Gráfico de varredura do acompanhamento do cultivo de *P. ostreatus*, com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.



Na Figura 21 observa-se a utilização da glicose durante o experimento correlacionando com a descoloração.

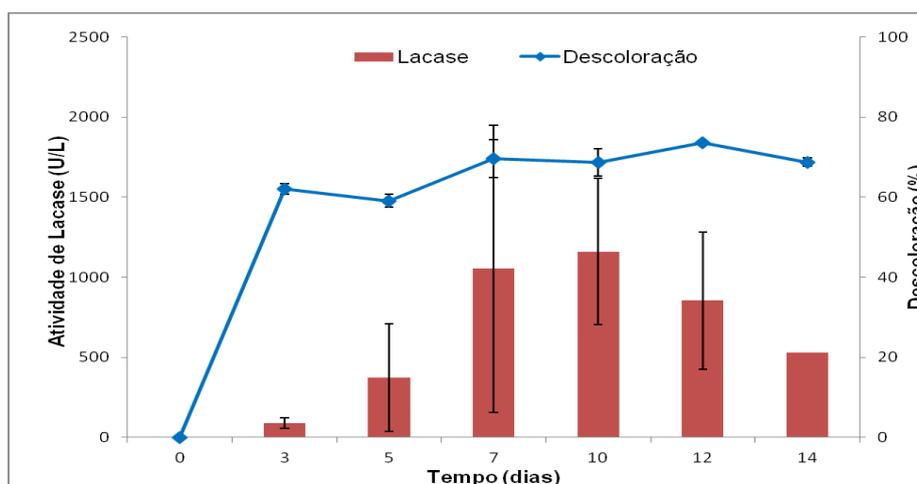
Figura 21 - Gráfico correlacionando o consumo de glicose pelo microrganismo com a descoloração observada no meio.



Na Figura 21 percebe-se que o maior consumo de glicose pelo microrganismo também ocorreu nos três primeiros dias (de 19,1 g/L inicial para 8,6 g/L), indicando que o processo de remoção de cor esteve relacionado com o consumo de glicose, seja pela adsorção na biomassa micelial crescente ou como consequência da atividade enzimática microbiana.

Observou-se, também, uma estagnação no consumo de glicose após o terceiro dia, indicando que o microrganismo pode ter passado a utilizar outras fontes de carbono presentes, ou seja, o próprio corante. O gráfico da Figura 22 mostra que a partir do terceiro dia houve aumento na produção da lacase, reforçando que o consumo de outras fontes de carbono pode ter mesmo acontecido.

Figura 22 - Gráfico correlacionando descoloração com atividade enzimática.



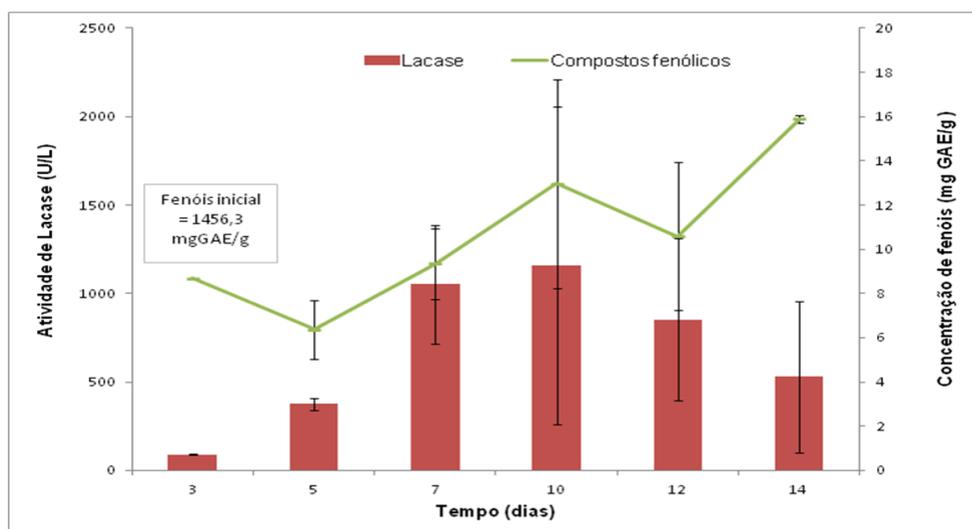
A atividade de Manganês Peroxidase e de Lignina Peroxidase não foi detectada nas amostras, provavelmente pelo fato delas terem sido congeladas ou então que o fungo não foi induzido a produzi-las, as condições do meio não eram ideais.

Interessante observar que mesmo com a produção de lacase aumentada não foi observada a descoloração do meio de cultivo (Figura 22). Talvez isso possa ser explicado por uma secreção enzimática para degradar corantes já adsorvidos no micélio, ou mesmo para degradar compostos fenólicos liberados

no meio durante a degradação inicial do grupo cromóforo (três dias iniciais). Ou também porque o fungo em alguns casos pode responder a alterações do meio, não somente à presença de fenólicos, mas ao esgotamento da glicose, que é repressor catabólico da produção de lacases.

A Figura 23 mostra que a quantidade de fenóis no meio nos três primeiros dias diminuiu de 1456,3 mg GAE/g para 8,7 mg GAE/g, que pode ter ocorrido por degradação ou adsorção no micélio.

Figura 23 - Gráfico de acompanhamento da atividade de Lacase e da concentrações de compostos fenólicos, durante acompanhamento do cultivo de *P. ostreatus*, com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.



Entre os dias 5 e 12 percebe-se que existe uma correlação entre a atividade de lacase e o aumento nas concentrações de compostos fenólicos no meio, provavelmente decorrente de degradação dos corantes. Os fungos da podridão branca, como o *Pleurotus ostreatus* podem produzir compostos fenólicos.

Os resultados obtidos nos gráficos das Figuras 21 a 23 mostram que houve atividade microbiana intensa nos três primeiros dias de cultivo, com o consumo de glicose e remoção simultânea de cor e de compostos fenólicos. Não ficou esclarecido, contudo, se a remoção de cor e de compostos fenólicos

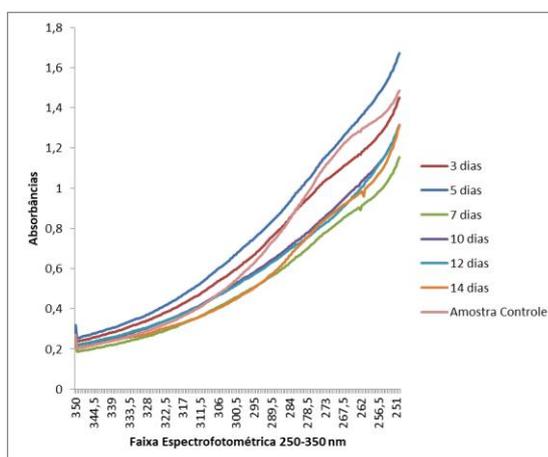
aconteceu por adsorção no micélio ou atividade microbiana. A falta de relação entre a descoloração e a atividade de Lacase parece indicar que inicialmente houve mesmo a adsorção de compostos na biomassa microbiana.

Capudi, Castro e Ramsdorf (2002) verificaram que ocorrem duas fases na degradação de aromáticos: primeiro a quebra do cromóforo, resultando em anéis de diferentes tamanhos e diferentes ligantes e por serem menores tornam-se mais estáveis sendo assim recalcitrantes exigindo um tratamento mais longo. Isso pode justificar a relação observada entre a concentração de fenólicos e a presença da enzima (Figura 23), a qual parece indicar que os processos de adsorção dos contaminantes no micélio e a biodegradação enzimática acontecem de maneira complementar.

Em seu estudo Nozu e Saldanha (2007) observaram que os fungos não gastam energia na biodegradação utilizando o carbono disponível para o crescimento. Em seu estudo Kang *et al.* (2014) observaram que a atividade de lacase mostrou um aumento gradual inicialmente 9 ~ 38 U/mL após 3 dias. Este padrão durou mais de 7 dias e a atividade atingiu 85 U/mL no sétimo dia.

Através das leituras de absorvância no comprimento de onda entre 250 e 350 nm verificou-se que a maior eficiência para degradação de compostos aromáticos se deu no sétimo dia do tratamento, corresponde à linha verde na Figura 24.

Figure 24 - Gráfico de varredura de remoção de aromáticos durante acompanhamento do cultivo de *P. ostreatus*, com 12,5% do resíduo de coloração de Gram, em condição submersa estática a 28°C.



Mas esse resultado de menor quantidade de fenólicos observado no sétimo dia (Figura 24) não se relaciona aos dados da Figura 23, na qual a menor quantidade de compostos fenólicos foi detectada no quinto dia. Isso parece indicar que a análise espectrofotométrica de varredura para aromáticos não é sensível. Provavelmente isso ocorre porque existem proteínas e outras substâncias que são detectadas nesses comprimentos de onda, deixando os resultados difíceis de analisar, por isso essa alteração entre os dias de cultivo (MORAES *et al.*, 2013).

A cinética do estudo 4 se mostrou interessante, pois não houve relação com o aumento da lacase e a descoloração. Foi curioso observar que ocorreu diferença entre as descoloração do corante nos estudos 3 e 4 na mesma condição de sem agitação 20 g/L de glicose.

Pode-se notar que ocorreu adsorção do corante nas biomassas, porém não foi possível detectar através dos testes de adsorção o que pode ser explicado pelo poder de adsorção da mesma.

Nos estudos de avaliação da biodegradação de corante de Gram dos trabalhos de Nozu e Saldanha (2007) e Souza (2009) foi usado o fungo *Pleurotus sajor caju* e parece que ele reagiu melhor ao corante do que o *P. sajor caju* experimentado no trabalho presente. Talvez isto se deva a utilização de resíduo de corante diferente, pois não se sabe ao certo quais eram e são as concentrações dos compostos nestes resíduos.

O tratamento mais eficiente para remoção da cor observado por Nozu e Saldanha (2007) foi o método combinado (fermentação líquida seguida de Peroxidação com Irradiação Ultra Violeta- POA) com 90% de eficiência para concentração de 6,25% e 96 % para concentração de 12,5% e para degradação de aromáticos 28% para concentração de 6,25 e 17% para 12,5%.

Para Souza (2009) a degradação de compostos aromáticos no processo combinado (biológico seguida de POA) na concentração de 6,25% foi de 35,6%

e para diluição de 12,5 foi de 43% e verificaram que não houve diferenças significativas entre as porcentagens de remoção de cor do efluente na concentração de 6,25% com 91,1% de descoloração.

Seria interessante avaliar um tratamento combinado (biológico seguido de POA) como feito nos trabalhos anteriores utilizando o *Pleurotus ostreatus* para ter uma comparação entre os métodos precedentes.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos em meio com SRCG solidificada com ágar e ABD verificou-se que a velocidade de crescimento não apresentou relação com a degradação do corante, sugerindo que esta análise deva ser qualitativa e não quantitativa.

Os fungos estudados cresceram na concentração de 6,25%, mas concentrações maiores apresentaram efeitos negativos na velocidade de crescimento radial, indicando a toxicidade da solução estudada.

Nos estudos para avaliação do crescimento com aumento da concentração do resíduo de corante observou-se o fungo *P. ostreatus*, que foi escolhido para continuidade do trabalho em meio líquido, auferiu descoloração total em quase todas as diluições, exceto na diluição de 50%, além de obter um crescimento médio de 5,7 mm/dia em concentração de 12,5% o que motivou a escolha da concentração.

Os ensaios em meio líquido revelaram que a utilização de casca de arroz interferiu nos resultados de remoção de cor e degradação de fenóis, pois adsorveu os grupos cromóforos e compostos fenólicos.

A condição de cultivo com melhores resultados com adição de glicose a 10g/L e 20g/L estático, sem agitação, com descoloração de 92,2% e 96,5% e remoção de fenóis 98,4% e 97,8% respectivamente.

Houve atividade microbiana intensa nos três primeiros dias de cultivo no estudo de cinética, com o consumo de glicose e remoção simultânea de cor e de compostos fenólicos. O basidiomiceto *P. ostreatus* obteve 67% de descoloração permanecendo a cor do meio inalterada até o final do cultivo e o maior consumo de glicose pelo microrganismo também ocorreu nos três primeiros dias (de 19,1 g/L inicial para 8,6 g/L).

Os bioensaios revelaram que com o aumento da produção da lacase não foi observado a descoloração do meio de cultivo e quantidade de fenóis nos três primeiros dias que diminuiu de 1456,3 mg GAE/g para 8,7 mg GAE/g.

A falta de relação entre a descoloração e a atividade de Lacase parece indicar que inicialmente houve mesmo a adsorção de compostos na biomassa microbiana.

O trabalho em questão foi de grande importância visto que possibilitou a repetição, com algumas variáveis, de metodologias propostas para o tratamento dos efluentes de corantes do laboratório de microbiologia e comprovar a eficiência de tais metodologias. Apesar disso, é necessária a continuidade dos estudos, pois alguns aperfeiçoamentos devem ser feitos com o objetivo de implementar esse tratamento com fácil aplicação e viabilidade econômica, e que mostre eficiência e bom desempenho ambiental.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Efetuar ensaios de toxicidade após os tratamentos;
- Realizar ensaios de avaliação do cultivo sólido do *P. ostreatus* sobre casca de arroz ou outra fonte lignocelulósica com o efluente;
- Fazer tratamento combinado de cultivo líquido biológico seguido de POA;
- Levantamento e custos e avaliação da viabilidade do processo, para uma futura implantação de sistema de tratamento do resíduo.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M. de; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p. 364-368, 2007.

ALMEIDA, E. J. R. **Estudo da biorremediação do azo corantes têxteis acid blue 161 e Procion Red mx – 5b por fungo filamentosos em solução simples e solução binária associado a testes de toxicidade com *Lactuca sativa* e *Artemia salina***. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

ALLGAYER, N.; RAUPP, W. A.; CANTARELLI, V.V. **Descarte de corantes e meios de cultivo utilizados na microbiologia**. Curso de Biomedicina da Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS. 2012. Disponível em: <<http://static.labnetwork.com.br.s3.amazonaws.com/wordpress/wp-Content/uploads/2015/10/Descarte-de-corantes-e-meios-de-cultivo-utilizados-na-microbiologia.pdf>>. Acesso em: 02 de nov. 2016.

ALVES FILHO, M. Organismos aquáticos são usados na detecção de contaminação por corantes. **Jornal da Unicamp**, Campinas. 25 de junho a 01 de julho de 2012, n. 531. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/unicamp/ju/531/organismos-aquaticos>>. Acesso em: 02 de nov 2016.

AZMI, W.; SANI, R. K.; BANERJE, U. C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme Microb. Technol.**, Feb 15;22(3):185-91, 1998.

CAPUDI M., CASTRO M. C., RAMSDORF W. **Biodegradação Fúngica de Compostos Lignocelulósicos e Corantes**. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Tecnologia em Química Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, 2002.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a partir de solo contaminado com Herbicidas Triazínicos. **Ciência Agrotec.**, Lavras, v. 32, n.3, p. 809-813, 2008.

CHAKRABORTY S., BASAK B., DUTTA S., BHUNIA B., DEY A. Decolorization and biodegradation of congo red dye by a novel white rot fungus *Alternaria alternata* CMERI F6. **Bioresource Technology** 147 662–666, 2013.

CONAMA Nº 358/2005 - "Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências." - Data da legislação: 29/04/2005 - Publicação DOU nº 084, de 04/05/2005, págs. 63-65.

DA SILVA; LEITE L.; MASELLI, B. S.; UMBUZEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F. P. Monitoring ecotoxicity of disperse red 1 dye during photo-Fenton degradation. **Chemosphere** 148 p.511e 517, 2016.

EL HAGE R, BROSE N, CHRUSCIEL L, SANCHEZ C, SANNIGRAHI P, RAGAUSKAS A. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. **Polym Degrad Stable** 94:1632-8, 2009.

EL-RAHIM W.M. A., HASSAN MOAWAD, AHMED Z. ABDEL AZEIZ, MICHAEL J. SADOWSKY. Optimization of conditions for decolorization of azo-based textile dyes by multiple fungal species. **Journal of Biotechnology**. 260, p. 11-17, 2017.

FAN, L.; SOCCOL, C. R. Produção de cogumelo comestível do tipo *Pleurotus*, *Lentinus* e *Flammulina* em casca e borra de café. **II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. p. 400-407, 2001.

FERR H. **Bioestatística na Prática**: - Comparando Médias. Vol. 1, 2017.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. **Adv Environ Res**. 7:239–247, 2002.

GAHLOUT M.; GUPTA S.; GUPTA A. Optimization of culture condition for enhanced decolorization and degradation of azo dye reactive violet 1 with concomitant production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma cupreum* AG-1. **Biotech** 3 143-152, 2013.

GERN R.M., WISBECK E., RAMPINELLI J.R., NINOW J.L., FURLAN S.A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, 99: 76-82, 2008.

KANG H. W, YANG Y. H, KIM S. W, KIM S., RO H. S. Decolorization of Triphenylmethane Dyes by Wild Mushrooms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 19: 519-525, 2014.

KUNJADIA P. D., PATEL F. D., NAGEE A., MUKHOPADHYAYA P. N., DAVE G.S. Crystal violet (triphenylmethane dye) decolorization potential of *Pleurotus ostreatus* (MTCC142). **BioResources**. 7(1), 1189-1199, 2012.

KUNJADIA P. D., SANGHVI G. V., KUNJADIA A. P., MUKHOPADHYAY P. N., DAVE G. S. Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* spp.) grown with azo dyes. **SpringerPlus** 5:1487, 2016.

KUNZ, A.; ZAMORA-PERALTA P.; MORAES, S. G.; DURÁN N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

MARTÍNEZ-HUITLE C. A., SANTOS E. V., ARAÚJO D. M., PANIZZA M. Applicability of diamond electrode/anode to the electrochemical treatment of a

real textile effluent. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 674 103-107, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** 31, 426-428, 1959.

MORAES C. S., OLIVEIRA JUNIOR F. O. R., MASSON G., REBELLO K. M., SANTOS L. O., BASTOS N. F. P., FARIA R. C.R. **Série em Biologia Celular e Molecular- Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas.** 84p., 2013.

MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas Lignolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MUHD J.N., BAGHERI S., BEE A.H. S. Recent advances in heterogeneous photocatalytic decolorization of synthetic dyes. **Sci World J.** ID 692307, 25 pages , 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/692307>. Acessado em 01 nov. 2017. ;

NOZU, L.L.; SALDANHA, P.C.A. **Avaliação de tratamento físico-químico e biológico de resíduos de corantes produzidos no laboratório de microbiologia.** 80p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

PALMIERI G., GIARDINA P., BIANCO C., SCALONI A., CAPASSO A., SANNIA G.. A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **J. Biol. Chem.** 272 31301–31307, 1997.

PARSHETTI G. K., PARSHETTI S. G., TELKE A. A., KALYANI D. C., DOONG R. A., GOVINDWAR S. P. Biodegradation of Crystal Violet by *Agrobacterium radiobacter*. **Journal of Environmental Sciences** 23(8) 1384–1393, 2011.

PRZYSTAS W., ZABLOCKA-GODLEWSKA E., GRABINSKA-SOTA E. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. **Brazilian Journal of Microbiology** 46, 2, 415-424 , 2015.

Resolução – RDC/ANVISA nº 306/2004 – “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde”. Data da legislação 7 de dezembro de 2004 . Publicação no DOU de 22 de dezembro de 2000.

RANI B.; KUMAR V.; SINGH J.; BISHT S.; TEOTIA P.; SHARMA S.; KELA R. Bioremediation of dyes by fungi isolated from contaminated dye effluent sites for bio-usability. **Brazilian Journal of Microbiology** 45, 3, 1055-1063 ,2014.

RIBEIRO, A. R.; UMBUZEIRO, G. A. Effects of a textile azo dye on mortality, regeneration, and reproductive performance of the planarian *Girardia tigrina*.

Environmental Sciences Europe. 26:22. 2014
 DOI: 10.1186/s12302-014-0022-5. Disponível em:
 <<https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-014-0022-5>>.
 Acessado em: 02 nov 2016.

ROSOLEN, L. A.; MONTEIRO, R.T.R.; DELLAMATRICE, P. M.; KAMIDA, H.M. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **Química Têxtil**, n. 76, p 44-52, 2004.

ROTONDARO E. E. **RESÍDUOS SÓLIDOS DE LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS: Caracterização e Disposição final.** Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT, 2003.

BOTTON S. R., **Destinação dos Resíduos Químicos de um Laboratório de Análise Clínicas : Uma Proposta de Modelo de Gestão.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria Centro de Tecnologia Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, 2011.

SHAHID A.; SINGH J.; BISHT S.; TEOTIA P.; KUMAR V. Biodegradation of Textile Dyes by Fungi Isolated from North Indian Field Soil. **EnvironmentAsia** 6(2) 51-57, 2013.

SILVA, M. C. **Degradação de Corantes e Remediação de Efluente Têxteis por Extrato Bruto de Peroxidase de Nabo.** 2011. 135p. Tese (Doutorado Agroquímica) – Departamento de Agroquímica, Univerdade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2011.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-149, 1965.

SIQUEIRA, L. F. de G.; ALMEIDA, R. G. ; BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*: *Revisão histórica.* **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, n. 4 p. 297-315,1983.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de Sistemas enzimáticos à degradação de corantes têxteis.** 2000. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) – Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2000.

SOUZA, D.R. **Avaliação da biodegradação e de processos oxidativos avançados no tratamento de corantes utilizados no laboratório de microbiologia.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Curso Superior de Tecnologia em Química Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

SOUZA, F. A.; ROSADO, R. F. Utilização de Fungos Basidiomicetos em Biodegradação de Efluentes Têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139- ISSN 1981-9951, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROMBINI, R. B., OBARA-DOI, S. M. Remoção de Cor e Análises Físico-Química de Efluentes de Indústrias Têxteis Tratados com *Ganoderma* spp. **Revista F@apciência**, Apuracarana-PR, ISSN 1984-2333, v.9, n.12, p.101-122,2012.

UPADHYAY P., SHRIVASTAVA R., AGRAWAL P.K., Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. 3 **Biotech**. 6 15, 2016.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Journal Food Chemistry, Barking**, v.111, p.816-823, 2008.

YAN K; WANG, H.; ZHANG, X. Biodegradation of crystal violet by low molecular mass fraction secreted by fungus. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 108 No. 5, 421–424, 2009.

XIN B.; CHEN G.; ZHENG W. Bioaccumulation of Cu-complex reactive dye by growing pellets of *Penicillium oxalicum* and its mechanism. **Water Research**, 44: 3565 - 3572, 2010.

ZHANG, S.; WANG, Z.; ZHANG Y.; PAN H.; TAO L. Adsorption of methylene blue on organosolv lignin from rice straw. **Procedia Environmental Sciences** 31 3 – 11, 2016.

ZOCOLO, J. G.; SANTOS, G.P.; VANDEMIATTI.J; VACCHI. F. I.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V. B. Using SPE-LC-ESI-MS/MS Analysis to Assess Disperse Dyes in Environmental Water Samples. **Journal of Chromatographic Science**, vol. 53, Issue 8. p. 1257-1264. 2014.